FACULTÉ MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

No 1

CONTRIBUTION
A
l'Étude Biochimique du Lait

THESE

présentée et publiquement soutenua devant la Faculté Mixte de Médecine Générale et Coloniale et de Pharmacie de Marseille

le 18 Juin 1946

par

Claude G. M. M. H. EYSSERIC
né le 2 Mars 1920 à Vaison (Vaucluse)
Licencié ès Sciences
Diplômé de Sérologie, de Microbiologie
et de l'Institut de Médecine et de Pharmacie Coloniale de Marseille

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE (Doctorat d'Etat)

Examinateurs de la Thèse	MM. ROCHE	Président
	RIMATTEI	
	DERRIEN	Assesseurs
	DUMAZERT	

IMPRIMERIE F. ROBERT ET FILS
24, Rue Moustier, 24
MARSEILLE

1946

CONTRIBUTION

A

L'ÉTUDE BIOCHIMIQUE DU LAIT

FACULTÉ MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE No

CONTRIBUTION
A
l'Étude Biochimique du Lait

THESE

présentée et publiquement soutenua devant la Faculté Mixte de Médecine Générale et Coloniale et de Pharmacie de Marseille

le 18 Juin 1946

par

Claude G. M. M. H. EYSSERIC
né le 2 Mars 1920 à Vaison (Vaucluse)
Licencié ès-Sciences
Diplômé de Sérologie et de Microbiologie
et de l'Institut de Médecine et de Pharmacie Coloniale de Marseille

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE (Doctorat d'Etat)

Examinateurs de la Thèse	MM. ROCHE	Président	
	RIMATTEI		
	DERRIEN	Assesseurs	
	DUMAZERT		

IMPRIMERIE F. ROBERT ET FILS
24, Rue Moustier, 24
MARSEILLE

1946

PERSONNEL ENSEIGNANT
DE LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Doyen : L. CORNIL — *Assesseur :* J. ROCHE

Doyen Honoraire : L. IMBERT

Professeurs Honoraires : MM. MOITESSIER, CASSOUTE, GAUJOUX, COTTE, AUBARET, AUDIBERT

Chargé de Cours Honoraire : M. TIAN

Secrétaire : J. COMTE. — *Bibliothécaire :* Mme PEROL

Professeurs :

Anatomie	SALMON
Anatomie Pathologique et Pathologie Expérimentale	CORNIL
Bactériologie	N...
Chimie Analytique et Hydrologie	RIMATTEI
Chimie Médicale	ROCHE
Clinique Chirurgicale	FIOLLE
Clinique Chirurgicale	N...
Clinique Exotique	HECKENBOTH
Clinique des Maladies Nerveuses	ROGER
Clinique Médicale	OLMER
Clinique Médicale	MATTEI
Clinique Médicale	MONGES
Clinique Médicale Infantile	GIRAUD
Clinique Obstétricale	VAYSSIERE
Clinique Ophtalmologique	JAYLE
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique	BREMOND
Clinique Urologique	CHAUVIN
Histoire Naturelle	GABRIEL
Histologie	ROMIEU
Hygiène Générale et Coloniale	VIOLLE
Médecine Légale	MOSINGER
Parasitologie	JOYEUX
Pathologie Chirurgicale	MOIROUD
Pharmacodynamie et Matière Médicale	F. MERCIER
Pharmacie	VIGNOLI
Physiologie	MORIN
Physique	N...
Thérapeutique	POINSO

Professeurs sans Chaire :

Stomatologie	BELTRAMI
Médecine Légale	POURSINES
Physique	DUBOULOZ
Parasitologie	SAUTET
Histoire Naturelle	BALANSARD

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Chargés de cours :

Clinique Dermatologique	VIGNE
Hydrologie Clinique et Thérapeutique	PIERI

Agrégés en exercice :

MM. BERTHIER	MM. R. IMBERT
CARCASSONE	PAILLAS
BRAHIC	AUDIER
FIGARELLA	DELPHAUT
ARNOUX	DOR
CHOSSON	RECORDIER

Chargés des fonctions d'agrégé :

Chimie Médicale	DERRIEN
Physiologie	DONNET
Physique	ROUX
Anatomie	GRISOLI
Propedeutique Médicale	J. OLMER

Enseignements complémentaires :

Embryologie	ROMIEU
Accouchements	CHOSSON
Anatomie Descriptive	GRISOLI
Chimie Minérale	ARNOUX
Chimie Organique	DUMAZERT
Clinique de la Tuberculose	BERTHIER
Clinique des Maladies Contagieuses	RECORDIER
Clinique Chirurgicale Infantile	IMBERT
Gynécologie	FIGARELLA
Cryptogamie	PELLISSIER
Médecine Opératoire (travaux pratiques)	LENA
Microbiologie (pharmacie)	GREBUS
Neuro-chirurgie	PAILLAS (suppléant)
Obstétrique	CHOSSON
Pathologie Chirurgicale	LAMY
Propédeutique Chirurgicale	LUCCIONI
Propédeutique Médicale	J. OLMER
Pharmacodynamie (pharmacie)	DELPHAUT
Psychiâtrie	ALLIEZ
Toxicologie	GUILLOT

À LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA MERE,

A MA GRAND'MERE

A MES FRERES JACQUES ET JEAN

AUX MIENS

A MES AMIS

AVANT-PROPOS

Un « séjour » de deux ans en Allemagne a retardé la présentation de ce travail en voie d'achèvement. Je veux exprimer ici ma reconnaissance à tous les maîtres et les amis qui ne m'oublièrent pas.

C'est d'abord à M. le Professeur J. ROCHE, qui a bien voulu m'accepter dans son laboratoire, que vont mes remerciements. Il me suffira de louer sa haute science, son indulgente bienveillance, qui fait du professeur un ami de ses élèves. Ses collaborateurs, MM. les docteurs Y. DERRIEN, chargé d'agrégation, et C. DUMAZERT, chargé de cours, qui m'ont guidé dans cette thèse, n'ont cessé de m'encourager de leur dynamisme, leur parfaite culture, leur cordialité souriante. Je leur dois mon initiation au travail si passionnant du laboratoire. Qu'ils veuillent bien trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

J'adresse mon respectueux souvenir à M. le docteur LAFOND, ancien pharmacien-chef à l'Hôtel-Dieu, qui a toujours montré à mon égard une inépuisable bonté et m'a orienté vers le laboratoire de M. le professeur ROCHE.

A toutes les personnalités qui m'ont aidé dans cette thèse j'exprime mes sentiments sincères de gratitude : à M. le professeur THIEULIN, qui a mis si obligeamment à ma disposition la revue *Le Lait*, qu'il dirige avec autorité ; à M^lle^ J. BRIGANDO, chef de laboratoire à la Sorbonne, pour l'aide qu'elle m'a apportée si aimablement lorsque les circonstances m'ont tenu éloigné de Marseille.

Et maintenant, avec le recul du temps, le souvenir de cette vie d'étudiant si agréable, si indépendante, me fait sentir plus vivement à quel point mes camarades du Laboratoire et de la Faculté rendirent agréable mon séjour rue Blanqui, par leur gaîté et leur gentillesse. J'y ai noué des amitiés que je n'oublierai pas.

J'adresserais aussi mon affectueuse pensée aux docteurs P. ACHARD, L. BAYLE, M. FOURNIER et A. GIBERT, qui furent toujours des amis éprouvés et fidèles.

Et pour revenir un peu mélancoliquement à ces deux années d'Allemagne, que mes camarades de captivité, et notamment mon ami A. Vicario trouvent ici le souvenir de moments quelquefois pénibles, où nous eûmes pour meilleurs compagnons un espoir et une foi inébranlables.

A MON JURY DE THESE

en respectueux hommage.

INTRODUCTION

Il a toujours été nécessaire d'aider la vertu, et au besoin de montrer son chemin par des exemples convaincants. Ceci dans tous les domaines. Mais c'est surtout en matière alimentaire que la fraude s'est fait le plus sentir et avec le plus d'ingéniosité. Aussi de tous temps le législateur s'est-il montré sévère à l'égard du fraudeur. Nous n'en voulons pour preuve que cette très vieille ordonnance classée dans les Archives du Puy-de-Dôme et signée Jacques DE TOURZEL, datée de 1481 et qui édicte : « Que tout homme ou femme qui aura vendu du lait mouillé sera attaché bien curieusement au pilori, qu'il lui sera mis un entonnoir dans la gorge et entonné ledit lait mouillé jusqu'à temps qu'un médecin ou barbier déclare qu'il n'en peut, sans danger de mort, avaler davantage. » Le contrôle alimentaire du lait est donc une nécessité inéluctable. L'analyse systématique permet aujourd'hui de le réaliser. Elle permet en outre le développement de certains autres points de vue qui, pour être plus spéculatifs et plus théoriques, n'en sont pas moins dignes d'attention.

I. — DE L'INTERET DE LA TECHNIQUE MICROANALYTIQUE DANS L'ETUDE DU LAIT

Le lait contient des éléments dont il est intéressant de connaître le mode de formation dans la mamelle, l'anabolisme, le processus des transformations qu'ils subissent pour parvenir à leur état définitif. Pour cela, il importe de disposer de techniques analytiques qui permettent d'aborder ce problème. L'utilité de pareilles méthodes est également justifiée dans l'appréciation de la valeur alimentaire d'un lait destiné à la consommation humaine.

Certains mammifères (vache, ânesse, etc...) possèdent une sécrétion suffisamment abondante pour que des dosages sur des quantités considérables de lait puissent être pratiqués sans inconvénients, que ces dosages aient pour but un contrôle alimentaire ou des recherches physiologiques. G. MATHIEU (138 *bis*) a étudié sous la direction de M. le professeur RIMATTEI l'influence des facteurs climatiques sur la constante moléculaire simplifiée et corrigée du lait de vache des hautes vallées alpines. Il a notamment mis en évidence d'intéressantes variations de la composition du lait avec l'altitude et l'ensoleillement de la région étudiée. Il n'en est pas de même du lait de petits animaux tels que le lapin, le cobaye, le chat, etc..., dont la secrétion lactée est très faible, ce qui a été pour beaucoup de biochimistes un obstacle à certaines recherches physiologiques, ces animaux constituant un matériel d'expérimentation très commode. ASDELL et ses collaborateurs (4) ont étudié l'influence d'injections intraveineuses d'extraits alcalins, puis d'extraits acides de pituitaires fraîches de mouton sur des lapines vierges ovariectomisées âgées de huit mois et à des lapins mâles et femelles âgés de cinq semaines. Sur les lapines de huit mois il a observé un développement des mamelles et de la sécrétion lactée. SURE-BARNETT (221) recherche les effets que peut avoir une alimentation riche en matières grasses sur la lactation du rat. Il n'est pas douteux que si ces auteurs avaient disposé de techniques leur permettant de déterminer la valeur des différents constituants de ces sécrétions, malgré les très faibles quantités de ces derniers, ils auraient certainement tiré de leur travail des conclusions plus intéressantes. D'ailleurs des efforts ont été tentés dans ce sens par BELLE (13) qui compare la composition du lait de différents mammifères (cobaye, chat, lapin) avec celle du lait de femme. Le doublement de poids à la naissance s'obtient d'autant plus vite que le lait est plus riche en protéines et en substances minérales. Pour ces analyses, cet auteur a été obligé de recourir à un nombre relativement considérable de sujets. Il aurait été certainement

plus pratique d'opérer sur des quantités faibles de lait, grâce à l'emploi de microméthodes appropriées.

L'intérêt de ces dernières se justifie aussi pour le lait de femme. Les travaux entrepris sur cette sécrétion au point de vue de sa valeur alimentaire vis-à-vis du nourrisson, des rapports qui existent entre l'état de santé de la mère et la composition de son lait, de l'influence qu'exerce sur les variations des différents éléments un certain nombre de facteurs, ou de l'observation de phénomènes physiologiques, ont été effectués en général sur des quantités relativement considérables de lait. Cet état de choses entraîne un certain nombre de difficultés qui résident toutes dans le fait que la sécrétion lactée de la femme est trop précieuse pour que l'on puisse sans inconvénient faire des prélèvements dont le nombre soit suffisant pour observer avec une précision absolue tous les problèmes que soulève la lactation humaine. De ce chef, un système de microméthodes aurait permis de supprimer ces obstacles dans les travaux que nous allons résumer et qui portent sur les variations des constituants du lait en fonction de différents facteurs et au point de vue clinique sur l'influence qu'exerce la composition du lait sur la diététique du nourrisson.

Influence de différents facteurs sur la comopsition du lait de femme

Nous empruntons à R. Paccard (156) les chiffres donnés par les différents chimistes en ce qui concerne le taux des principaux éléments du lait de femme. Ainsi que le dit fort justement cet auteur, l'écart entre les chiffres qui sont présentés rend compte de l'amplitude des variations offertes par le lait de femme.

TABLEAU I. — *Limites des variations du taux des principaux composants normaux du lait de femme exprimés en grammes pour* 1.000 cm^3

AUTEURS	Extrait sec	Lipides	Glucides	Protides	Cendres
Agasse-Lafond ...	100 à 160	20 à 60	65 à 80	8 à 15	1 à 3
Arthus	93 à 114	15 à 38	59 à 65	9,7 à 13,5	2 à 2,5
Barral	129 à 164	15 à 74,5	60 à 78	9 à 15	1,1 à 2,8
Bell		34,5	64	19,7	2,75
Deniges	132	40	72	11	2
Fleury	112 à 164	18 à 62	58 à 78	9 à5 50	1 à 1,9
Leprince et Lecoq ...	130	38	68	21	3
Marfan	124	36	70	13	
Myers		38,5	60	15,8	2,10
Raydnitz ...	130	50	64	6 à 10	1,4 à 2,8

Beaucoup d'auteurs n'ont pu analyser la sécrétion prénatale, qui n'est que de 2 à 6 cm^3. Un ensemble de techniques adaptées à ce volume aurait permis de contrôler avec plus de sensibilité les variations des divers éléments qui constituent cette sécrétion.

On a, par ailleurs, souvent essayé de suivre l'influence de facteurs pathologiques sur la composition du lait. Une fatigue assez accusée (départ de clinique), d'après Helmutt Gölz (91) provoque un abaissement du taux des matières grasses. L'obésité, elle-même, autant qu'on puisse la considérer comme un état pathologique, a fait l'objet de travaux de certains auteurs ; Vincent et Vial (232) relèvent qu'il ne semble pas y avoir de relations entre le métabolisme des nourrices obèses et le taux butyreux de leur lait.

Des analyses effectuées aux Offices collecteurs de Pforzheim et d'Erfurt montrent une corrélation entre la quantité de matières grasses du lait et les affections des glandes mammaires ou les états pathologiques généralisés (M.-E. Kayser) (109). La tuberculose, suivant Vernois et Becquerel (230), entraîne une augmentation des chlorures et une diminution des protides et des lipides. La syphilis semble provoquer une élévation de la teneur en beurre et une variation en sens inverse des sels. Dans le diabète sucré, la glande possède encore le pouvoir d'empêcher le passage du glucose dans le lait, et son activité synthétique, selon M. Husset-Bierry (104), constitue un mécanisme efficace pour transformer en lactose tous les glucides apportés. H. Gölz (91) affirme que des couches pathologiques, une rétention placentaire, une endométrite, des suppurations, sont la cause d'un accroissement du taux des graisses dont les variations sont parallèles à la marche de la maladie. Le même auteur précise en outre que lorsqu'un organisme maternel est inondé de toxines provoquant des lésions sur la glande telles que celle-ci perd ses facultés sélectives et cesse d'être en état de produire les principaux constituants de sa sécrétion dans un état de concentration déterminé, la glande mammaire élabore cependant une sécrétion largement indépendante de la quantité de matières premières qu'elle reçoit.

Un certain nombre de chimistes se sont demandés si le lait produit par chacun des deux seins avait la même composition. Brown, Massy, Nims et Hunscher (35) répondent par l'affirmative. Pour Gölz il n'y a aucune différence en ce qui concerne la teneur en matières grasses chez la femme primipare, alors que Zappert et Jolles (241) assurent que le sein gauche donne un lait plus nutritif et plus riche en graisses (0,4 g. p. 100 pour les albuminoïdes, 0,6 g. p. 100 pour les matières grasses). Pour ces dernières, Vincent et Vial constatent un écart de 5 à 10 g. p. 100 entre chaque sein. Finkelstein (76), Grimmer (93), Bleyer (25) observent quelques différences aux mêmes heures de la journée. Erickson,

Gulick, Hunscher et Macy (72) trouvent que le sein droit et le sein gauche présentent sensiblement la même teneur en azote total et en azote aminé.

Beaucoup d'auteurs se sont attachés à étudier les différents facteurs des éléments du lait et en particulier des cendres, de l'extrait sec, des protides et des glucides et des lipides. Pour M. Husset-Bierry, le poids des cendres croît à partir du trentième jour qui précède la naissance jusqu'au dixième jour qui la suit. Schlossmann (205) affirme que, contrairement à ce que prétend Engel (71), les sels ne diminuent pas progressivement jusqu'à la fin de la lactation, mais que leur variation s'arrête après l'obtention d'un certain minimum.

Le taux de l'extrait sec d'après Gölz présente peu de différence entre l'état initial et l'état final, au cours de la tétée. Les protéines, suivant M. Husset-Bierry, affectent les mêmes variations que les cendres. Les remarques de Schlossmann et de Engel s'appliquent également aux albuminoïdes. Widdows et ses collaborateurs (239) notent que le taux des protéines s'élève rapidement les premiers jours de l'accouchement. Les mêmes auteurs remarquent qu'il en est de même du lactose. M. Husset-Bierry (104) trouve que ce dernier, faible les derniers jours de la gravidité, présente un minimum au moment de l'accouchement, croît ensuite rapidement jusqu'au dixième jour, à partir duquel il se stabilise ; cette stabilisation est plus rapide chez les multipares. Deval (59) note de même que la teneur en glucides du lait augmente à mesure qu'on s'éloigne de la date de l'accouchement. Les conclusions de Denis, Fritz et Talbot (54) sont analogues, Paccard, M. Husset-Bierry s'accordent pour reconnaître que la phase de la tétée et le moment du prélèvement ont peu d'influence sur les variations du lactose.

Il n'en est pas de même des matières grasses, dont les variations ont été particulièrement étudiées : elles augmentent du commencement à la fin de la tétée (Vernois et Becquerel, Bleyer, Finkelstein, Thieme (281), Engel. Par contre, Müller et H. Gölz n'observent que de faibles fluctuations.

En ce qui concerne la quantité du lait, une hypergalactie rend le lait plus riche en matières grasses (Gölz). Finkelstein soutient le contraire, alors que Birk (23) examinant une femme de 34 ans nourrissant depuis trois ans avec une production journalière moyenne de deux litres, remarque que la teneur des matières grasses et des autres constituants reste à peu près constante.

On pourrait conclure aussi des travaux de cet auteur que la durée de la lactation ne constitue pas un facteur de variation des lipides du lait, tout au moins au bout d'un certain temps après l'accouchement. Gölz fixe à deux mois après la délivrance le

moment où se stabilise le taux des lipides. A la montée du lait, ces derniers, faibles, augmentent jour après jour jusqu'à un palier maximum. A l'encontre de cette opinion et de celle de Deval, Mollgard constate un abaissement de la teneur des matières grasses.

On a mis aussi en évidence les répercussions que pouvait avoir le régime alimentaire sur la composition du lait ; selon H. Deen (49), un régime carné ou chargé en graisses fait monter le taux des lipides. Pour Gölz, une lipémie alimentaire ne correspond à aucun accroissement de ces derniers dans le lait. Honcampp affirme qu'une nourriture surabondante ou insuffisante peut faire varier la quantité de lait mais non le taux de matières grasses. Chaque femme, explique Aurnhammer (5) est en effet adaptée à une production moyenne de graisses qu'il n'est pas possible de dépasser.

On remarquera la diversité et le caractère contradictoire des thèses soutenues par tous ces auteurs. Il est certain qu'en effectuant des analyses très fréquentes, on arriverait à se faire une idée plus précise des variations des éléments du lait en fonction de divers facteurs. Les discordances que nous avons relevées dans ces divers travaux s'effaceraient peut-être, quelques-uns d'entre eux ne s'appuyant que sur un nombre relativement restreint de déterminations. H. Gölz s'est parfaitement rendu compte de l'importance de ces considérations. Ses travaux représentent 355 déterminations individuelles. Mais que l'on songe au volume de lait que des recherches aussi consciencieuses ont nécessitées. Si l'on admet qu'il lui a fallu 20 cm^3 chaque fois, cela ne fait pas moins de 7.100 cm^3 de lait qui ont été soumis à l'analyse. On peut légitimement penser que ces prélèvements ont parfois été une gêne pour les donneuses. Si les analyses avaient pu être réalisées sur 1 cm^3 de lait au lieu de 20 cm^3 il n'y aurait eu aucun inconvénient à multiplier les prélèvements.

Mais la façon dont ceux-ci sont conduits est-elle aussi responsable de la diversité des conclusions admises par les différents auteurs au cours de la tétée par exemple ? Ch. Porcher (171) a mis en évidence les difficultés que soulève l'exécution d'un prélèvement correct : l'engorgement du sein conduit à une rétention lactée qui entraîne les cristalloïdes au niveau des acini mammaires. A la tétée suivante, on récolte un lait qui n'a plus la même teneur en sucres. Gölz attribue aussi à de mauvaises techniques d'évacuation du sein les divergences d'opinions qu'il constate au sujet des variations des matières grasses aux diverses phases de la tétée : « La sécrétion des lipides, dit-il, se poursuit en principe uniformément, le retard dans leur élimination s'explique par la viscosité accrue qu'ils présentent vis-à-vis des autres constituants

du lait. » Si on prélève celui-ci avec les mêmes précautions qu'emploie physiologiquement le nourrisson, on observe des résultats analogues à ceux qu'ont enregistrés Engel, Bleyer, Finkelstein, Thieme. Mais si, comme le fait Gölz, on a recours à une aspiration pratiquée par la femme elle-même, opération dans laquelle le sein est toujours soumis à des manipulations plus ou moins maladroites, les matières grasses se répartissent uniformément et l'on ne constate que de très faibles variations entre le début et la fin de la tétée. Pendant la traite, Vincent et Vial recueillent des fractions de 15 cm^3 dans de petites éprouvettes numérotées identiques, jusqu'à épuisement de la glande : au fur et à mesure que s'effectue la mulsion, la quantité de beurre augmente. Mais Plauchu et Rendu ont assez justement signalé que si l'on connaît bien la composition du lait obtenu au début d'une tétée on est beaucoup moins bien renseigné sur celle du lait recueilli au milieu ou à la fin. Qu'on nous permette de faire remarquer qu'il serait facile de combler cette lacune en effectuant des prélèvements répétés de faible importance au cours de la tétée : nous sommes persuadés qu'en pratiquant un certain nombre de prélèvements de 1 cm^3, au cours de la tétée, on éviterait tous les inconvénients rencontrés par les auteurs que nous avons cités, et les données obtenues seraient parfaitement précises. On supprimerait ainsi les obstacles d'un ordre spécial qu'ont mentionnés C. Vincent et Vial. Souvent, disent-ils, la mère ne veut pas soustraire du lait à son enfant ; d'autres fois le mamelon présente une forme défectueuse impropre à la traite manuelle que ces auteurs considèrent comme bien préférable aux meilleurs tire-laits. Le facteur psychique aussi a son importance : la timidité et la sensibilité des donneuses entraînent également dans certains cas une inhibition presque absolue de la sécrétion. Ces auteurs conseillent de vider complétement le sein pour faire une analyse objective. Nous estimons que si on propose à la mère de distraire seulement 1 cm^3 de son lait, elle ne soulèvera aucune objection. Enfin si l'on voulait réaliser une vidange complète du sein, on parviendra au même résultat en faisant une moyenne des chiffres trouvés sur des prises d'essais suffisamment nombreuses ou mieux encore en prélevant une goutte aux différentes phases de la tétée et en mélangeant les produits obtenus de façon à obtenir un volume d'au moins 1 cm^3. Ainsi sans troubler la mulsion, à peu de frais, et commodément on aura réalisé un échantillon moyen parfait. Si l'on veut analyser le lait d'une journée, on prélèvera également une goutte à chaque traite.

Les considérations que nous venons d'envisager ne perdent pas de leur importance dans la diététique du nourrisson. Trop souvent, déclare pertinemment le Docteur Lapierre (123), parce qu'on ne peut recueillir assez de lait, on se contente d'un seul prélèvement. Le laboratoire trouve que le pourcentage de matières

grasses est insuffisant, et on sèvre le nourrisson, initiative qui risque d'avoir de graves conséquences, « on ne s'est pas rappelé qu'il faut vider les deux seins, mélanger ce lait, et prélever l'échantillon nécessaire de cette quantité pour l'épreuve à faire ». On ne saurait donc s'entourer de trop de précautions quand il s'agit de déterminer la valeur alimentaire d'un lait, valeur qui dépend de tant de facteurs.

C'est ainsi que certains laits sont toxiques pour le nourrisson. Paccard (156) a rappelé les désordres qu'avaient entraîné chez un enfant, dans la Nourricerie Départementale du Vinatier, un lait dont la teneur en protéines, chlorures, lactose était trop élevée. M. Husset-Bierry (104) signale le cas d'une femme qui, à son sixième accouchement, sécrétait un lait qui semblait alimenter d'une façon insatisfaisante son enfant : cette humeur contenait trop peu de lactose : 45 à 50 gr. pour 1.000 au dixième jour, et n'avait pas présenté d'augmentation progressive notable du troisième au dixième jour. Par contre, suivant Desbrousse (58), une richesse trop grande en lactose est souvent la cause des diarrhées du nourrisson. Ces diarrhées, d'après Gibbens (90) sont attribuables à des laits trop pauvres en albuminoïdes. Une humeur trop riche en matières grasses risque aussi de troubler la santé du nourrisson (Golz).

C'est donc bien souvent une proportion anormale d'un élément par rapport aux autres qui est responsable des troubles digestifs présentés par l'enfant au sein. Il semble donc nécessaire de contrôler la qualité du lait qu'on donne au nourrisson aussi souvent qu'il est possible. On se rend compte des avantages que pourrait apporter un système de microméthodes appropriées permettant d'effectuer des contrôles fréquents.

II. — BIOCHIMIE ANALYTIQUE DU LAIT

Les techniques analytiques doivent tenir compte de la complexité d'un milieu tel que le lait. Il contient à la fois des vitamines, des diastases, des lipides, des glucides et des albuminoïdes. La structure de ces derniers est remarquablement intéressante. Comme beaucoup de protéines, la caséine possède un groupement prosthétique dans sa molécule, l'acide sérine-phosphorique.

L'existence de ces groupements dans les molécules protéiques complexes est un fait très fréquent, on pourrait même dire presque constant. Les pigments respiratoires tels que l'hémoglobine renferment, en dehors d'un substrat protéique pur, la globine, une fraction prosthétique colorée : l'hématine, qui contient un atome de fer central. Dans les hémocyanines, le fer est remplacé par le

cuivre. Les nucléotides se caractérisent par l'existence d'un reste phosphorylé lié à un sucre et à des bases puriques et pyrimidiques.

Mais très souvent l'élément non azoté est représenté par un sucre. Ainsi les mucroprotéines ont toutes dans leur molécule un ou plusieurs restes glucosamine. L'enveloppe protéique du corps de certains bacilles est caractérisé par la présence de glucides spéciaux qui paraissent souvent responsables de la virulence du germe. L'importance du groupement prosthétique a été souvent mise en évidence en biochimie. Ainsi, dans les pigments respiratoires, les réactions d'oxydoréduction ont lieu grâce à lui. Les propriétés essentielles de la molécule dépendent de lui, par exemple, les caractères généraux des pigments respiratoires : affinité pour les gaz, spectres. La spécificité de certains sérums vis-à-vis des virus dépend de sucres combinés aux protéines sériques.

Aussi l'attention des biochimistes s'est-elle portée sur un grand nombre de molécules protéiques susceptibles de libérer des sucres. Les protéines sanguines, l'ovalbumine, les mucines, etc... ont fait l'objet d'études variées. Le lait mérite comme les autres humeurs cette attention. Ce point de vue se justifie d'ailleurs par les innombrables analogies que cette sécrétion présente avec le sang. Toutes deux sont des milieux isotoniques contenant, bien qu'en proportion différente des cendres, des lipides, un sucre libre. Nous mettrons plus loin en évidence les frappantes analogies qui existent entre les protéines du sang et celles du lait. Le lait contient de la caséine, le sang du fibrinogène ; ces deux albuminoïdes renferment de fortes proportions de phosphore et exigent pour leur coagulation la présence d'ions calcium. Dans le lactosérum, de même que dans le sérum sanguin, on peut fractionner des globulines et des albumines dont les précipitations se situent à des taux identiques en phosphates de potassium. Divers auteurs ont montré les autres caractères fort nombreux qui rapprochent les sérum-albumines et les sérum-globulines sanguines et lactées. Comme le sérum sanguin, le lactosérum est caractérisé par des agglutinines spécifiques. Dujarric de la Riviere et Kossovitch (61) ont montré qu'on pouvait classer les laits de femme en groupes analogues aux groupes sanguins, groupes qui se correspondent en général. Les phénomènes d'anaphylaxie provoqués quelquefois chez le nourrisson sont ainsi attribuables à l'apport de protéines étrangères entraînant des troubles du même ordre que ceux qui sont causés par l'introduction de globules rouges dans le sang d'un receveur dont le groupe n'est pas celui du donneur.

Il est donc légitime de penser que, comme le sang, le lait de femme renferme des sucres combinés. La caséine du lait de vache a d'ailleurs, à ce point de vue, été l'objet de quelques travaux de la part de certains auteurs. Mais à notre connaissance l'étude

systématique des glucoprotéides du lait de femme n'a pas été tentée.

Par ailleurs, on peut se demander s'il y a identité entre les protéines du lait des diverses espèces animales. Porcher (172) a affirmé que, chez quelles espèces que ce soit, le lait était une entité sécrétoire ayant sa physionomie propre et dont les grandes lignes sont toujours retrouvées. Ceci est vrai dans l'ensemble, mais dans le détail de la composition du lait on relève toujours un certain nombre de différences suivant les espèces, ainsi qu'en fait fois le tableau ci-dessous donné par le même auteur. (174).

TABLEAU II. — *Comparaison de la composition du lait de femme et de celle du lait de vache*

	Lait de femme	Lait de vache
Cendres	2.25	7.25
Chlorures	1.10 — 1.25	1.80
Chaux	0.35 — 0.40	2.00 — 2.10
Phosphates bi et tricalciques, magnésique, mono et bipotassique	0.60 (P^2O^5)	1.25
Caséine	5.00 — 5.50	28.30
Albumine	1.50	4.5
Globuline	3.00	0.50 — 0.25

Ce tableau met en évidence la disproportion qui existe entre les matières salines du lait de vache et celles du lait de femme. Signalons en passant que ces différences expliquent la difficulté de coagulation du lait de femme par les moyens habituellement employés pour faire floculer le lait de vache. La preuve en est que si l'on ajoute à la sécrétion lactée humaine des sels en quantité suffisante on obtient la coagulation, tandis que si l'on dialyse le lait de vache, la caséine ne précipite plus dans ce dernier. D'autre part le lait de vache renferme environ trois fois plus de protéines que le lait de femme. Ces dernières et les protides du lait bovin sont dans un rapport très différent : il n'y a pour ainsi dire pas de globuline dans le lait de vache, alors que dans le lactosérum humain elles constituent la plus importante fraction azotée. La quantité de caséine de lait de vache est au moins cinq fois plus importante que celle du lait de femme. Notons que ce fait aussi, auquel s'ajoute la présence de globulines protectrices, rend compte de la difficulté que présente la caséine humaine à coaguler, ce qui explique les obstacles rencontrés dans la détermination de cette protéine.

Par contre le dosage de la caséine dans le lait de vache a été effectué très souvent au moyen de méthodes assez diverses. Les

principes qui ont inspiré ces méthodes consistent à peu près tous à faire floculer la caséine à son point isoélectrique au moyen d'agents très variés, en général des acides ou de l'alcool. Cependant, à notre connaissance, l'emploi des sels neutres pour réaliser par relargage la séparation et le dosage de la caséine dans le lait n'a jamais été systématiquement envisagé. Par contre les sels neutres ont été utilisés concurremment à l'emploi d'autres agents de précipitation pour étudier le fractionnement de la caséine ou des protéines du lactosérum, mais en général les travaux de ce genre ont toujours porté, au moins en ce qui concerne la caséine, sur le produit déjà isolé du lait lui-même dans lequel la protéine peut se trouver dans un état fort différent.

Les données générales qui précèdent nous amènent aux conclusions suivantes :

1°) En raison des modifications apportées à la physiologie normale de la lactation par la vie moderne, il est indispensable de pouvoir décider d'une façon catégorique si une femme est capable ou non d'allaiter son enfant. Dans ce but, des analyses fréquentes aussi complètes que possible sont susceptibles de donner les renseignements indispensables. L'emploi de microméthodes s'impose d'une façon évidente pour que ces analyses, qui doivent être répétées pour être significatives, ne constituent pas pour la mère un motif d'opposition ou de refus dans l'exécution du prélèvement ;

2°) D'autre part on peut se demander si le lait de femme présentant par ailleurs des analogies remarquables avec l'humeur sanguine ne possède pas, au même titre que cette dernière, des substances de nature glucidique liées à certains constituants ;

3°) Enfin, en poussant plus loin ces analogies, il est permis de penser qu'on peut appliquer au lait en général certaines méthodes qui ont conduit au fractionnement des protéines sanguines. Une telle manière de procéder fournirait peut-être des renseignements sur la constitution des protéines lactées, et tout au moins nous donnerait un moyen simple et pratique de doser l'une de ces protéines.

Ce sont ces considérations qui ont dicté notre travail.

III. — OBJET DU TRAVAIL

I. — Dans une première partie, nous avons cherché à établir un ensemble de techniques n'exigeant qu'un volume extrêmement réduit de lait, voisin de 2 cm^3, sur lesquels on doit pouvoir réaliser les déterminations essentielles : évaluation des sucres, des protéines, des matières grasses, des chlorures, de l'extrait sec, des cendres. Pour cela, il nous a été nécessaire de faire appel à des

microméthodes déjà éprouvées en biochimie et de vérifier si, grâce à des modifications appropriées, leur adaptation au lait était possible. Dans certains cas, une telle mise au point a représenté l'élaboration complète d'une technique.

Nous montrerons dans un chapitre spécial les applications de ces microméthodes, par exemple dans le fonctionnement des centres spéciaux de collecte du lait de femme ; ce fonctionnement requiert des contrôles qui ont pour but de mettre en évidence les falsifications éventuelles de ce lait mercenaire par les donneuses. Nous nous étendrons, par ailleurs, assez longuement sur le fonctionnement de ces centres dans différents pays et sur leurs indications, pensant que cette question trop rarement étudiée mérite un certain développement.

II. — Dans un autre groupe de chapitres nous nous attacherons à l'étude des sucres combinés aux protéines du lait de femme.

Nous avons tenu auparavant à faire un bref historique des études qui ont été faites sur les autres humeurs ou les autres molécules protéiques, et notamment sur le sang et les protéines plasmatiques. Nous avons examiné les différentes techniques proposées pour la détermination de ces sucres. Nous nous en sommes inspiré dans l'étude que nous présentons. Mais le milieu que nous examinions et les conditions qu'il nous imposait nous faisaient une nécessité d'élaborer des méthodes différentes.

Nous avons cherché à obtenir des renseignements du même genre et par d'autres techniques sur le lait de femme. Nous nous sommes efforcé de démontrer l'existence de sucres combinés dans le lait humain au moyen d'agents hydrolysants appropriés et de mettre au point une méthode de dosage de ces glucides à l'échelle microanalytique ;

III. — L'existence des rapports entre les sucres combinés du sang et ceux du lait devait nous amener à essayer de préciser les quelques analogies qui rapprochent le sang et le lait au point de vue protéique.

« Le lait envisagé comme une solution colloïdale ou pseudo-colloïdale, constitue un ensemble protéique fort complexe. Les colloïdes du lait sont mélangés intimement les uns aux autres... » (Porcher) (172). Ce complexe renferme essentiellement des globulines, des albumines et de la caséine. Nous envisagerons les divers travaux entrepris sur leur fractionnement en vue d'élucider le nombre et la constitution de ces substances protéiques et plus particulièrement ceux de la caséine. Celle-ci et les autres albuminoïdes du lactosérum sont-ils des composants homogènes ? Nous étudierons auparavant en un sommaire exposé les différentes recherches effectuées sur leur nature et notamment sur l'état de la caséine dans le lait. Nous passerons fort rapidement sur le

dosage et sur les propriétés de cette substance azotée. Enfin, nous efforçant à notre tour d'apporter une contributin au fractionnement des protéines du lait de vache, nous exposerons les résultats auxquels nous ont conduit l'emploi de la méthode de relargage par les sels neutres dont l'application aux protéines de plusieurs autres humeurs a fourni déjà de si précieux renseignements. Nous tenterons de tirer les conclusions qui ressortent de ces résultats, surtout en ce qui concerne l'homogénéité de la caséine et des autres lactoprotéines, et les moyens de parvenir à leur détermination exacte. En effet nous avons essayé de mettre au point un microdosage de la caséine, basé sur sa précipitation par addition d'une quantité bien déterminée de sel neutre.

PREMIERE PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES SUR LA MICROANALYSE DU LAIT DE FEMME

I. — MICRODOSAGE DES MATIERES GRASSES

Nous avons montré l'importance du dosage des lipides dans la diététique du nourrisson. En fait, il représente un des points essentiels de l'analyse au point que AGASSE-LAFONT (2) a pu dire : « La mauvaise qualité du lait que reçoit le nourrisson peut-être due à l'insuffisance des éléments nutritifs, mais aussi à leur excès... ». Cet auteur déclare « qu'il suffit de doser l'extrait sec, les sels minéraux, le lactose, le beurre ». Un enfant qui ne « profite pas », ou présente des troubles gastro-intestinaux est souvent un enfant auquel on donne un lait trop riche en matières grasses. Mais le dosage des lipides du lait humain offre des difficultés considérables ; beaucoup de techniques comme les méthodes optiques de dosage du beurre du lait de vache sont impossibles à adapter au lait de femme. Les méthodes chimiques qui se recommandent par leur précision ne sont pas tellement nombreuses. Celles qui présentent à cet égard toute satisfaction, sont en général assez longues et exigent des prises d'essai considérables.

EXPOSE DES TECHNIQUES

Nous n'insisterons pas sur les méthodes optiques d'une précision très relative, comme celle de ZEISS (in 161), qui utilise le réfractomètre, ou celle de DONNE (in 90 bis), — perfectionnée par VOGEL (in 90 bis) et FESER (in 90 bis) —, qui s'appuie sur l'opacité du lait pour en déterminer la richesse en graisses, ou encore celle de GIRARD (90 bis) qui apprécie la teinte que prend le lait sous une faible épaisseur.

Nous laisserons également de côté de vieilles méthodes physiques que décrivent tous les manuels et qui n'ont qu'un intérêt historique : méthode au crémomètre de CHEVALIER (in 90 bis) contrôleur FJORD (in 90 bis) etc...

Nous ne décrirons pas davantage dans les méthodes volumétriques, plus précises cependant, celle de MARCHAND (in 161) au lactobutyromètre, modifié par SALLERON (lactobutyromètre à curseur), ESBACH (in 53) (matras butyromètre); les réactifs utilisés pour libérer et dissoudre les graisses sont fort divers : mélange ammoniaque, éther, alcool (GIRARD [90 bis], DENIGES [53]), acide sulfurique puis alcool amylique (TEICHERT) (in 207), phosphate disodique et alcool butylique (SICHLER) (in 231 bis), chlorure de sodium, sel

de Seignette et soude, puis alcool butylique (Sal) (in 119). Lutz (in 161) saponifie par la lessive de soude et épuise les acides gras obtenus, par un mélange éthéro-alcoolique.

La bouteille d'essai normale de Babcock (in 127) est un flacon spécial gradué permettant la lecture directe des graisses à l'état liquide, après leur libération par l'acide sulfurique et centrifugation. Modifiée par le « Bureau of Standard » pour sa trop faible sensibilité, elle a été « perfectionnée » par Lister-Gerber (in 29) avec son acidubutyromètre. Ce dernier a été fort critiqué par Hoyberg (102), Pozzi-Escot (177), qui lui reprochent notamment la complication inutile des réactifs, l'absence de données officielles pour la vérification des graduations et les dangers opératoires, par Fort (85), qui observe que les chiffres indiqués par l'appareil ne correspondent pas exactement au pourcentage de matières grasses contenues dans l'échantillon déterminé.

Lobstein et Flatters (134) résument fort bien les critiques essentielles que l'on peut formuler contre les méthodes volumétriques en général. Pour effectuer la conversion du volume lu en poids, on se base sur une composition et une densité moyennes du beurre, données qui sont loin d'être constantes. D'autre part les graisses sont modifiées par le contact de certains réactifs (acide sulfurique chaud, par exemple) et sont forcément plus ou moins impures (alcools amylique, butylique). Enfin la séparation ne peut pas être totale, ce qui explique la remarque de Hoyberg au sujet de la méthode de Gerber. Ces critiques justifient l'emploi des méthodes pondérales.

Méthodes pondérales. — Bordas et Touplain (30) traitent 10 cm^3 de lait par l'alcool à 65° acétique. Après centrifugation le culot est dégraissé par un mélange éthéro-alcoolique ; les solutions éthéro-alcooliques sont évaporées, desséchées et pesées. Mais contrairement à ce que ces auteurs prtendent et bien qu'en faibles proportions, l'alcool à 65° utilisé pour coaguler les protéines dissout des matières grasses.

La Méthode Officielle Française (144) indique deux procédés, avec centrifugation et sans centrifugation. Dans le premier, 10 cm^3 de lait sont déféqués par l'alcool à 95°, on centrifuge, on lave à l'alcool-éther. On chasse par distillation les solvants, on dessèche le beurre qui reste et l'on pèse.

Une des meilleures méthodes de dosage est celle d'Adam-Meillère (in 53) qu nous avons prise comme méthode de référence, elle se rapproche beaucoup de la précédente, mais avec un protocole expérimental beaucoup plus satisfaisant. L'appareil d'Adam, appelé galactomètre, est une allonge à robinet ou une ampoule à décantation de préférence, ou même une boule à brôme, d'une contenance de 50 cm^3 environ. On introduit 10 cm^3 de lait. On

ajoute 20 cm³ du réactif d'Adam (1). On bouche et on agite avec ménagement par renversements répétés. On laisse reposer 5 minutes. Deniges (53) et Pellerin (161) conseillent de placer l'appareil dans un bain d'eau tiède ou chaude pour favoriser la séparation en deux couches. A notre avis cette précaution est superflue. L'une des deux couches obtenues, la supérieure est transparente, colorée en jaune (pour le lait de vache), l'autre est opaline. Chavastelon et Edouard ajoutent quelques gouttes d'une solution saturée à chaud de Rouge Soudan III, afin de mieux observer la séparation entre les deux couches. Nous avons parfaitement pu opérer sans cette modification. On ouvre le robinet et on laisse couler le plus lentement possible la liqueur opaline inférieure. On recommence cette opération de la même façon. Après avoir soutiré la liqueur aqueuse, on enlève avec un morceau de buvard roulé en cornet très mince les dernières traces d'eau qui restent dans la queue de l'appareil. On soutire alors la solution butyreuse dans un cristallisoir préalablement taré. On rince l'ampoule avec 2 ou 3 cm³ d'éther à trois reprises différentes. Après avoir chassé l'éther par évaporation à l'étuve à 37°C, puis à l'étuve à 100°C, on pèse. On multiplie le résultat par 100 et l'on obtient la teneur en lipides pour un litre de lait. Il faut évidemment se servir d'un matériel parfaitement propre et exempt de traces de graisses, aussi conseillons-nous de laver préalablement à l'éther le matériel utilisé.

L'épuisement des matières grasses peut se faire aussi par l'appareil de Soxhlet. Dans le procédé sans centrifugation de la méthode officielle française, 10 cm³ de lait sont coagulés par 25 cm³ d'alcool à 85° acidifiés au millième par de l'acide acétique. Le coagulum filtré est lavé avec de l'alcool à 35°, essoré entre deux feuilles de papier buvard, puis introduit dans l'appareil à épuisement de Soxhlet. On verse 10 cm³ d'alcool à 95° en laissant le précipité s'humecter un instant. Dans le petit ballon de l'appareil on met 40 cm³ d'éther et on épuise comme de coutume en chauffant l'éther dans un bain d'eau vers 40°C. L'épuisement terminé, on détache le ballon de l'appareil. On chasse par distillation l'éther et l'alcool. Le beurre est desséché à 100°C, puis pesé. Mais l'arrêté n'indique ni la durée de l'épuisement, ni celle de la dessication. Nous n'utiliserons pas ce procédé pour les raisons suivantes : le coagulum qui est simplement essoré entre deux feuilles de papier filtre contient encore de l'alcool à 35°. Or celui-ci renferme encore du lactose et de la caséine. De plus l'alcool à la température de 40°C, utilisé pour l'extraction, enlève lui aussi de

(1) Réactif d'Adam : 100 cm³ d'éther, 100 cm³ d'alcool ammoniacal composé lui-même comme suit : alcool à 90°, 834 cm³ ; ammoniaque pure, acide sulfurique, 65,5 cm³ ; eau distillée q.s.p. 1.000 cm³.

la caséine. Lobstein et Flatters (134) ont mis en évidence la présence dans la liqueur butyreuse de produits réduisant la liqueur de Fehling ; d'autre part, Villiers, Collin et Fayolle (231 *bis*) avaient déjà remarqué pendant l'évaporation le brunissement de cette même solution butyreuse. Ces défectuosités du mode opératoire entraînent de grosses erreurs par excès qui sont équilibrées, d'après Lobstein et Flatters, par l'absence dans le liquide d'extraction de presque tout l'acide butyrique, qui est plus soluble dans l'eau que dans le solvant. Mais il ne faut pas oublier que le lait de femme ne contenant que des traces d'acide butyrique, cette compensation d'erreurs n'existerait plus et nous serions conduit par cette méthode à des résultats très mauvais.

On peut également extraire les graisses par les solvants bouillants, au moyen de l'appareil de Kumagawa et Suto. Il y a déjà longtemps Kumagawa et Suto (118) imaginaient un appareil qui leur permettait d'enlever les graisses aux tissus animaux et végétaux par l'alcool bouillant. Vladesco (233) utilise ce procédé pour doser les matières grasses du lait. En 1930, Porcher et Maynard (176) comparent sur le lait les chiffres obtenus par la méthode de Meillère avec ceux que donne l'appareil de Kumagawa et Suto. Les premiers, Kobstein et Flatters (134) étudient systématiquement les résultats auxquels conduit ce même appareil dans des conditions expérimentales analogues à celles dans lesquelles Lemeland se place pour l'utilisation de cette méthode dans le dosage des lipides du sang, à savoir : après épuisement du coagulum lacté dans l'appareil en question par l'alcool à 95° pendant une durée qu'ils fixent à 8 heures, ils évaporent le liquide d'extraction sous pression réduite à 50°C dans le vide sulfurique pendant 15 heures. Ils remarquent que l'alcool à la température de 79°C enlève au coagulum de la caséine, ce qui entraîne une erreur par excès, et que des conditions de dessication mal définies peuvent provoquer des pertes de l'ordre de 10 p. 100.

Certains auteurs ont eu l'idée de déshydrater le lait avant de l'épuiser. Grandeau, Kuhn, Duclaux (in 113) dessèchent le lait au bain-marie en présence d'une matière inerte (sable, marbre pulvérisé) avant d'entreprendre l'épuisement. En 1928, Paget (157) songe à déshydrater le lait à froid par du sulfate de sodium anhydre. Deux chimistes russes, Vavilov et Kogan (228), réalisent une grosse économie de temps en desséchant le lait par du plâtre. La matière sèche obtenue est ensuite pulvérisée et traitée au soxhlet. La méthode de Lecomte (in 53) mérite une mention spéciale ; elle consiste à absorber une quantité déterminée de lait avec du sulfate de sodium anhydre et à épuiser par l'éther. On triture dans un mortier 20 gr. environ de sulfate neutre de sodium anhydre finement pulvérisé. On ajoute peu à peu 10 cm^3 de lait, de façon à obtenir une masse bien homogène qu'on place sous une cloche

de verre et qu'on abandonne une heure à la température extérieure. Après avoir pulvérisé avec précaution la masse compacte obtenue, on introduit en tassant légèrement dans un tube de verre effilé de 20 cm³ de longueur, large de 3 cm. et muni à l'intérieur d'un fort tampon de coton hydrophile recouvert de deux à trois grammes de sulfate de sodium anhydre. On épuise à froid au moyen de l'éther anhydre, avec lequel on aura eu soin de laver auparavant le mortier. On continue l'épuisement, jusqu'à ce qu'une goutte de liquide ne tache plus le papier à la sortie du tube d'épuisement. On évapore l'éther, on sèche le résidu à 100°C, on pèse ; le poids trouvé, multiplié par 100, donne le poids de matières grasses par litre de lait.

Dosage des lipides dans le lait de femme.

Nous diviserons les méthodes en deux groupes : celles faisant appel à des quantités considérables de lait et celles qui ne demandent que des prises d'essai relativement restreintes.

On a appliqué au lait de femme beaucoup de techniques de dosage des graisses du lait de vache, ainsi la technique d'Adam et celle de Lecomte, déjà décrites. Barral (8) dose en même temps que la caséine et le lactose le beurre du lait humain sur 10 cm³ et utilise comme réactif l'alcool méthylique ou l'alcool formolé. Ville et Derrien (231), à partir de 10 cm³ de lait, se servent du galactomètre d'Adam. A vrai dire, il n'y a pas de raison pour que les méthodes chimiques ne donnent pas de résultats aussi satisfaisants pour le lait de femme que pour le lait de vache.

Agasse-Lafont (2) indique un dosage avec la méthode d'Adam ; il cite également une méthode physique par centrifugation de 10 cm³ de lait dans un tube à long col étiré et gradué en 1/10 de cm³ ; on mesure le volume qu'occupent les globules ainsi rassemblés, par rapport à la masse totale du lait. Hemutt-Gölz (91) a proposé en 1940 l'utilisation de la méthode au butyromètre de Gerber qui, d'après lui, donne une précision suffisante : Nous n'insisterons pas sur les inconvénients que présentent ces méthodes volumétriques dont nous avons signalé les défauts plus haut (v. p. 30).

Les méthodes suivantes exigent des quantités réduites de lait, de l'ordre du centimètre cube :

Denis et Talbot-Harvard (55) dosent les lipides sur 1 cm³ de lait par la méthode néphélométrique de Bloor. Iochelsohn (105) verse sur une rondelle de papier filtre de 11 cm. de diamètre qu'il place dans une capsule de 12 cm., 1 cm³ de lait goutte à goutte sur toute la surface. Il laisse sécher, place le tout à l'étuve à 110°C pendant 10 minutes environ. Après refroidissement, le papier filtre seul est placé à l'exsiccateur quelques minutes sur un verre

de montre. L'auteur extrait ensuite par un solvant convenable et il pèse à nouveau. Par différence entre les deux pesées, il prétend obtenir les matières grasses du lait. Nous citons la technique pour mémoire.

Plus précises nous semblent les deux méthodes proposées par Clavera et Moreno-Martin (43). Le premier mode opératoire est le suivant : on libère les graisses de leur émulsion par l'acide chlorhydrique et on les dissout dans le chloroforme. Pour cela, 1 cm³ de lait est disposé dans un tube à essai, on ajoute la même quantité d'acide chlorhydrique concentré. On agite. On chauffe. On introduit le mélange dans une fiole à décantation. On lave le tube avec 15 à 20 cm³ de chloroforme. On sépare la solution lipidique sauf la couche noirâtre dépourvue de graisse qui s'est formée. On évapore et on pèse. La deuxième méthode se résume ainsi : on libère les matières grasses par la soude après dissolution dans l'éther, on centrifuge et l'on décante la couche butyreuse. Dans un tube à centrifuger de 10 cm³ gradué, on introduit 0,5 à 1 cm³ de lait ; on saponifie par 4 à 5 gouttes de lessive de soude à 30 p. 100. On ajoute 4 à 5 cm³ d'eau. Après avoir complété à 10 cm³ avec de l'éther, on bouche, on agite et on centrifuge. Il se forme deux couches : en bas le lactoplasma alcalin, en haut la solution éthérée qu'on décante dans un cristallisoir taré ; le lactoplasma est lavé à l'éther, on centrifuge à nouveau ; les liqueurs de lavage obtenues sont jointes à la liqueur éthérée qu'on évapore et qu'on pèse.

Polonovski et Lespagnol (168) précipitent les protéines de 1 cm³ de lait par l'acide silico-tungstique, lavent le précipité jusqu'à ce qu'il ne contienne plus de lactose, et épuisent ensuite par l'éther de pétrole. Mais on peut se demander si le lactosérum ne renferme pas encore une quantité faible mais non négligeable de matières grasses.

Choix de la technique.

De toutes les méthodes décrites, peu sont en somme à retenir pour atteindre le but que nous visons. Celles qui sont précises ne peuvent être adaptées au lait humain sans perdre beaucoup de leurs qualités, tout au moins si l'on veut leur donner un caractère de microméthode. La mise au point de la technique que nous proposons résulte de nombreux contrôles et on en trouvera plus loin la justification expérimentale. Voyons quelles sont les considérations qui nous ont guidé pour fixer les différents temps de cette technique.

1° Ne pas utiliser de réactifs susceptibles d'altérer les matières grasses ;

2° Opérer la deshydratation du lait à froid pour la même raison;

3° Epuiser le magma obtenu au moyen d'un solvant capable d'extraire toute la matière grasse et seulement la matière grasse.

Tout d'abord on conçoit qu'il soit nécessaire d'opérer l'extraction du beurre par les solvants en l'absence d'eau. Cette déshydratation du lait s'effectue commodément par addition d'un sel anhydre. Ainsi que le préconise LECOMTE, nous avons arrêté notre choix sur l'addition de sulfate de sodium anhydre en quantité suffisante, de façon à ce que l'hydratation (cristallisation SO4Na2, 10 H20) conduisent à l'obtention d'un produit pulvérulent par addition au lait. Nous inspirant des techniques d'extraction des graisses du lait par les solvants organiques, nous avons adopté la méthode ci-après. Celle-ci réalise une application d'ordre semi-microanalytique, elle permet en effet de travailler sur 1 cm^3 de lait.

Mais il faut employer, pour triturer 1 cm^3 de cette humeur avec 3 gr. de sulfate de sodium, un mortier de trop faible capacité. Avec celui que l'on utilise en général, les pertes, eu égard au faible volume des substances employées, nous conduisaient à des erreurs par défaut considérables. D'autre part, le volume d'éther nécessaire pour épuiser le magma obtenu était trop important et nous obligeait à employer un cristallisoir d'une contenance trop grande pour le poids du résidu que nous voulions peser après évaporation. Il nous fallait donc trouver un moyen d'épuiser le lait avec une quantité très restreinte de solvant, en faisant, par exemple, passer plusieurs fois l'éther qui avait déjà servi à une première extraction. Mais là aussi nous étions entraîné à des pertes.

Nous devions donc répondre aux conditions suivantes :

1° Utiliser un cristallisoir assez léger pour nous permettre d'effectuer les pesées sans cause d'erreurs ;

2° Epuiser complètement le mélange sulfate de soude-lait par une faible quantité d'éther ;

3° Eviter les transvasements générateurs de pertes ;

4° Eviter également le mélange du lait et du sulfate de soude dans un mortier.

Le mode opératoire suivant satisfait à ces diverses exigences.

Nous avons imaginé un petit appareil qui repose sur le même principe que celui de Kumagawa. C'est un tube en verre Pyrex cylindrique, le plus mince et le plus léger possible, n'excédant pas 4 ou 5 grammes, à bords renforcés, long de 11 cm. 5, avec un diamètre de 3 cm. Grâce à deux enfoncements pratiqués environ au niveau du tiers supérieur de sa hauteur, on peut adapter une petite allonge en verre, prolongée par un tube contourné. Le récipient est fermé par un bouchon de liège percé d'un trou par

lequel passe la queue d'un petit réfrigérant ascendant (voir fig. 1).

FIG. 1. — *Appareil pour extraction des lipides du lait de femme.*

Mode opératoire. — Dans l'allonge on introduit un filtre plissé (nous conseillons, pour qu'il épouse la forme cylindrique de l'allonge, de le plisser sur un gros crayon ou une baguette assez grosse, cylindrique, à sections perpendiculaires à l'axe) ; on dispose une certaine quantité de sulfate de sodium parfaitement anhydre et finement pulvérisé, suffisante pour remplir la cartouche de papier filtre — environ 3 grammes — et en tassant le plus possible. On introduit la cartouche dans le tube en Pyrex préalablement taré sur une balance sensible au 1/10 de milligramme. Goutte à goutte, lentement, on verse 1 cm³ de lait frais et préalablement homogénéisé.

On laisse 15 minutes en contact le lait et le sulfate de soude, puis on verse sur le magma obtenu 1 à 2 cm³ d'éther de pétrole sec, de façon à imbiber le mélange, et 4 à 5 cm³ dans le fond du tube en Pyrex, que l'on bouche et auquel on adapte le petit réfrigérant ascendant ; le tout est disposé dans un bécher contenant de l'eau, et porté au bain-marie. Avec un thermomètre, on surveille la température, qu'on maintient aux environs de 80 à 85°C. L'éther de pétrole bout et les vapeurs viennent se condenser au-dessus de la cartouche, dans laquelle elles retombent goutte à goutte en réalisant ainsi un épuisement parfait. Au bout de 30 minutes environ, l'extraction est terminée. On porte le tube en Pyrex à l'étuve à 37°C puis à l'étuve à 100°C jusqu'à poids constant. On pèse, la différence entre le résultat trouvé et le poids de la tare donne le poids de beurre par litre de lait.

Nous avons effectué plusieurs dosages suivant cette technique. Les résultats obtenus ont été confrontés avec ceux donnés par la classique méthode d'Adam, mise en œuvre sur un même lait.

TABLEAU III. — *Poids de beurre (en gr. p. 1.000 cm³ de lait) trouvé sur un même lait, respectivement par la méthode d'*Adam *et par notre microméthode.*

Laits	Technique proposée	Méthode d'Adam
1	24.2	24.27
2	22.8	23.11
3	22.8	23.11
4	30	29.08
5	31.3	31.63
6	25.1	24.42
7	28.1	28.35
8	26.8	27.1

Nous avons contrôlé la fidélité de cette microméthode en effectuant plusieurs essais sur le même lait :

TABLEAU IV. — *Poids de beurre (en gr. p. 1.000 cm³ de lait trouvé sur un même lait respectivement par notre microméthode et par celle d'*Adam *:*

Laits	Technique proposée				Méthode d'Adam
9	18	15,5	19.3	19.3	19.81
10	19.2	19.3	19.5	19.5	19.72
11	26.7	26.6	27	27	27
12	29	29.2	29.2	29.2	29.45

Il faut noter que le premier essai sur le lait n° 9 a été effectué après une extraction de 20 minutes seulement ; le second après

une extraction de 15 minutes. Nous remarquons que les résultats obtenus ne sont que très légèrement inférieurs à ceux que donne la méthode d'ADAM. On peut s'étonner de la faible teneur en lipides des laits que nous avons étudiés ; cela est dû à ce que nos dosages ont porté sur du lait « jeune », c'est-à-dire recueilli chez des femmes venant d'accoucher depuis moins de quinze jours. La même observation est valable pour les dosages du lactose que nous avons pratiqués également sur un lait colostral. Les limites qu'AGASSE-LAFONT assigne aux variations normales du taux de beurre du lait de femme sont de 20 à 60 gr. par litre.

CONCLUSIONS.

La méthode utilisée possède les qualités suivantes : elle permet de bénéficier des avantages inhérents à l'utilisation des appareils de KUMAGAWA et SOXHLET : épuisement rapide et rationnel, tout en éliminant les défauts de ces techniques. Nous n'avons pas utilisé de réactifs risquant d'entraîner des substances non lipidiques comme l'alcool à faible titre, ou d'altérer les matières grasses à épuiser, ou de libérer, comme dans le cas de la mise en œuvre d'acide sulfurique, des produits glucidiques liés aux protéines du lait (voir chapitre des sucres combinés). Le solvant auquel nous nous sommes arrêté, l'éther de pétrole, est un produit facile à obtenir pur, tandis que l'éther sulfurique ordinaire contient une assez forte proportion d'eau. Il constitue par ailleurs le solvant par excellence des matières grasses. Grâce aux faibles volumes utilisés de ce réactif, on éviter l'élimination de ce dernier par distillation ou évaporation sous le vide, opérations longues et fastidieuses.

Notre technique se recommande par sa simplicité d'exécution : elle n'exige pas un outillage compliqué ; un chimiste habitué au travail du verre est à même de construire lui-même les différents éléments de l'appareil que nous proposons. Les réactifs utilisés ne sont pas nombreux : deux seulement (sulfate de soude anhydre et éther de pétrole). Ce sont des produits extrêmement courants. Le mode opératoire est très simplifié. Il se borne à deux mesures précises : un pipettage de 1 cm^3 et une pesée facile à exécuter avec une balance de précision au $1/10^e$ de mg.

C'est une méthode rapide : dix minutes pour mettre en train, trente-cinq minutes consacrées à l'extraction, dix minutes pour la pesée. Notons d'ailleurs qu'on évite une perte de temps en se servant du poids trouvé après l'extraction comme tare pour un prochain dosage. Il est possible de pratiquer plusieurs déterminations à la fois, car le dispositif expérimental est peu encombrant : on branche les réfrigérants en série et on peut utiliser un bain-marie assez grand pour contenir cinq à six appareils. C'est un dosage direct qui n'exige aucune libération préalable de graisse ni défé-

cation du lait. C'est une méthode fidèle, puisque plusieurs dosages effectués sur des essais différents du même lait nous donnent des résultats identiques. Enfin, la comparaison avec la méthode d'Adam prouve son exactitude.

En résumé, par sa fidélité, sa précision (2 p. 100) sa simplicité d'exécution, cette technique paraît parfaitement adaptée au dosage de faibles quantités de graisse dans le lait humain.

II. — MICRODOSAGE DU LACTOSE

Nous n'envisagerons ni les méthodes polarimétriques préconisées par THIBAULT, FLEURY (77), BOLL et BAUD (29), VILEY et DENIGES (52) après défécation avec des réactifs divers, ni des méthodes biochimiques (KAYSER) (109), (HUBBARD et BROCK) (103), inapplicables à l'échelle microanalytique. Parmi les méthodes chimiques, de nombreuses macrométhodes sont sans intérêt pour nous. Nous renvoyons, pour leur exposé, aux thèses de M. PACCARD (156) et de M. HUSSET-BIERRY (104).

Nous ne retiendrons que les microméthodes proposées pour le lait humain. POLONOVSKI et LESPAGNOL (168) après déprotéinisation silico-tungstique oxydent les glucides du lait de femme par un mélange sulfochromique sur 1 cm³ de lait. A notre avis, ce dosage est entaché d'erreur, ne serait-ce que, nous le montrerons plus loin, à cause de la défécation silico-tungstique. De plus, l'acide chromique n'est pas réduit que par le lactose mais aussi par toutes les autres substances oxydables qui se trouvent dans le filtrat. DENIS et TALBOT-HARVARD (55) évaluent le lactose sur 1 à 2 cm³ par la méthode de FOLIN et MAC ELLROY.

M. HUSSSET-BIERRY (104) préconise l'usage du microbertrand (H. BIERRY) (19), adaptation à l'échelle microanalytique de la méthode de BERTRAND. On utilise pour le dosage 5 cm³ de liqueur sucrée et 2 cm³ de liqueur cupro-alcaline. La séparation de l'oxydule de cuivre se fait par centrifugation. M. HUSSET-BIERRY affirme qu'à condition d'observer scrupuleusement certaines précautions, on arrive à apprécier des quantités de sucres correspondant à 1 mg. de galactose.

JACOBSEN (106) a employé pour la détermination du lactose dans le lait, la méthode HAGEDORN-JENSEN (94). Il faut diluer le lait suffisamment pour que l'échantillon sur lequel on opère contienne de 0,1 à 0,5 mg. de lactose. La durée de l'ébullition est de 45 minutes, et le mémoire original contient une table qui permet de transformer les valeurs trouvées lors du titrage par l'hyposulfite en pourcentage de lactose.

Nous pensons en effet que la technique de HADEDORN-JENSEN peut parfaitement convenir au lait de femme, mais en substituant comme DUMAZERT (62) l'a fait pour le sang, à la défécation zincique, la déprotéinisation cadmique bien plus satisfaisante. Nous renvoyons, pour la description de son mode opératoire dans la glycémie libre et pour son analyse détaillée, à la thèse de DUMAZERT.

Cependant cette méthode n'exige qu'une prise d'essai de 0,01 cm³ de lait ou même de 0,005. Nous estimons qu'une technique plus simple portant sur 0,1 cm³ suffit amplement.

Au contraire, les méthodes iodométriques ont retenu notre attention pour des raisons que nous exposerons plus loin. En milieu alcalin, l'iode oxyde des aldoses en acides aldoniques d'après la réaction (Bougault) (31) :

$$R.\,CHO + I^2 + H^2O \rightarrow R.\,COOH + 2\,I\,H$$

Cette réaction quantitative — quand on opère dans certaines conditions — est spécifique des aldoses car les cétoses ne sont pas oxydables dans ces mêmes conditions. Le lactose étant un aldose, il peut être dosé suivant ce principe à la condition d'éliminer du milieu les autres constituants du lait oxydables par l'iode, ce que nous comptons réaliser par la déprotéinisation cadmique.

Cette technique a fait l'objet d'une mise au point particulière de la part de Dumazert qui a montré que trois conditions sont indispensables à l'exploitation satisfaisante des réactions ci-dessus : opérer à froid, en milieu alcalin, et en un temps constant. Dumazert concilie ces trois facteurs en utilisant un mélange de phosphates tampon, en acidifiant largement par l'acide sulfurique pour libérer complètement l'iode, et en ajoutant immédiatement après une solution saturée de borate de sodium.

Pour l'utilisation de cette méthode adaptée au lait, quel mode de déprotéinisation préalable est-il nécessaire de choisir ? Nous n'avons utilisé ni l'acide trichloracétique ou l'acide acétique à 2 p. 100 (Boll et Baud) (29), ni l'alcool acétique (Méthode officielle française) (144), qui peuvent détruire les liaisons labiles de certains produits réducteurs (V. p. 127) ou désalbuminer imparfaitement, ni le réactif acétopicrique d'Esbach, conseillé par Deniges ou le réactif citropicrique (Fleury) (77), car il laisse filtrer des substances oxydables non glucidiques, ni l'acide métaphosphorique additionné d'un mélange albumineux (¹) (Deniges) (53), qui augmente le temps de filtration et conduit à des filtrats troubles. Nous n'utiliserons pas davantage la défécation phosphotungstique (Soichoro Mjura) (215), ou silicotungstique (Polonovski) (168), Dumazert ayant montré que la défécation tungstique conduit pour le sang à des résultats trop élevés. Ce même auteur a indiqué d'autre part que la déprotéinisation zincique appliquée au sang est perméable à des produits réducteurs en quantité encore plus importante que la désalbumination tungstique. Plus rationnelle est la déprotéinisation mercu-

(¹) Mélange albumineux de Deniges : Un blanc d'œuf, 150 cm³ d'eau, 3 cm³ d'acide acétique pur. Filtrer. 1 cm³ de ce réactif, 5 cm³ de lait, 1,5 cm³ de métaphosph. Na 5 %.

Table de correspondance en glucose (mgr. p. 0,1 cm3)

du nombre de centimètres cubes de thiosulfate de sodium N/200 employés au dosage

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0	0.385	0.382	0.379	0.376	0.373	0.370	0.367	0.364	0.361	0.358
0,1	0.355	0.352	0.350	0.348	0.345	0.343	0.341	0.338	0.336	0.335
0,2	0.331	0.329	0.327	0.325	0.323	0.321	0.318	0.316	0.314	0.312
0,3	0.310	0.308	0.306	0.304	0.302	0.300	0.228	0.226	0.244	0.292
0,4	0.290	0.288	0.266	0.284	0.282	0.280	0.278	0.276	0.274	0.272
0,5	0.270	0.268	0.286	0.264	0.262	0.260	0.258	0.256	0.264	0.253
0,6	0.251	0.249	0.247	0.245	0.243	0.241	0.240	0.238	0.236	0.234
0,7	0.232	0.230	0.228	0.226	0.224	0.222	0.221	0.219	0.217	0.215
0,8	0.213	0.211	0.209	0.208	0.206	0.204	0.202	0.200	0.199	0.197
0,9	0.195	0.193	0.191	0.190	0.188	0.186	0.184	0.182	0.181	0.179
1,0	0.177	0.175	0.173	0.172	0.170	0.168	0.166	0.164	0.163	0.161
1,1	0.159	0.157	0.155	0.154	0.152	0.150	0.148	0.146	0.145	0.143
1,2	0.141	0.139	0.138	0.136	0.134	0.132	0.131	0.129	0.127	0.125
1,3	0.124	0.122	0.120	0.119	0.117	0.115	0.113	0.111	0.110	0.108
1,4	0.106	0.104	0.102	0.101	0.099	0.097	0.095	0.093	0.092	0.090
1,5	0.088	0.086	0.084	0.083	0.081	0.079	0.077	0.075	0.074	0.072
1,6	0.070	0.068	0.066	0.065	0.063	0.061	0.059	0.057	0.056	0.054
1,7	0.052	0.050	0.048	0.047	0.045	0.043	0.041	0.039	0.038	0.036
1,8	0.034	0.032	0.031	0.029	0.027	0.025	0.024	0.022	0.020	0.019
1,9	0.017	0.015	0.014	0.012	0.010	0.008	0.007	0.005	0.003	0.002

rique, soit au nitrate (Patein et Dufau) (159), (Pappel et Richemont), Fleury et Marque (78), à l'acétate (Deniges) (52), ou au sulfate mercurique (M. Husset-Bierry) (104). Mais la démercurisation complète du filtrat est assez délicate et assez longue pour que nous renoncions à l'adopter pour le dosage du lactose humain.

Combinant, pour la déprotéinisation du sang, le nitrate de mercure et l'hydrate de cadmium, C. Dumazert et M. Bierry (64) constatent que les actions propres de ces réactifs s'ajoutent. D'après ces auteurs, ce procédé permet d'obtenir des filtrats absolument dépourvus de mercure, donc d'éviter l'élimination de ce métal par la poudre de cuivre et d'avoir, après précipitation, des liqueurs absolument neutres, contenant un léger excès de cadmium qui ne gêne en rien le dosage. M. Husset-Bierry adapte cette technique au dosage du lactose du lait de femme sur 1 cm³ de lait, alors que 0,1 cm³ aurait été largement suffisant.

D'autre part, nous avons constaté que l'hydrate de cadmium seul se prêtait aussi au microdosage du lactose dans le lait humain. Ce procédé dû à Fujita et Iwatake (89), modifié et adapté par Dumazert (62) au dosage de la glycémie libre a donné à ce dernier des filtrats exempts de produits réducteurs non glucidiques et contenant tout le glucose libre. Appliquée au lait, cette méthode nous a fourni d'excellents résultats.

Nous avons donc adopté la technique suivante qui comprend deux temps principaux.

1° *Déprotéinisation :* Dans un petit tube à essai de 6 cm. de longueur muni d'un bec, on introduit 2 cm³ de liqueur cadmique (1) on mesure avec précaution 0,1 cm³ de lait à la micropipette. On agite avec un fin agitateur en verre. On laisse en contact cinq minutes. Puis on précipite l'hydrate de cadmium par la solution de soude 0,275 N. Le précipité d'hydrate de cadmium fixe les protéines du milieu. On filtre.

2° *Dosage :* Dans un flacon en verre blanc bouchant à l'émeri et d'une capacité de 60 cm³, on a recueilli le filtrat de déprotéinisation cadmique ainsi que les eaux de lavage. On ajoute 5 cm³ de réactif prosphaté (2), puis 2 cm³ de solution d'iode de 0,0625 N, exactement mesurés ; on bouche soigneusement après avoir rincé les parois avec un jet de micropissette. On prépare un essai témoin contenant les mêmes quantités de réactifs. On laisse en contact

(1) Réactif cadmique : sulfate de cadmium cristallisé pur, 13 gr. acide sulfurique, 65,5 cm³ ; eau distillée, q. s. p. 1.000 cm3.

(2) Solution tampon phosphatée : phosphate dissodique pur à 2 mol., 17,8 gr. ; solution de soude 0, 1 N, 350 cm³ ; eau distillée q. s. p., 1.000 cm³..

trente minutes. Au bout de ce laps de temps, on ajoute 3 cm³ d'acide sulfurique N, on agite rapidement, et l'on repasse immédiatement en milieu presque neutre par l'addition de 10 cm³ de solution saturée de borax. On évalue l'excès d'iode avec la solution d'hyposulfite N/200 versée au moyen d'une burette de 25 cm³ graduée au vingtième de cm³ et pourvue d'une pointe effilée de façon à apprécier la demi-division.

Il y a intérêt à observer scrupuleusement le temps d'oxydation aussi bien sur l'essai témoin que sur le lait. Aussi, est-il préférable d'espacer de trois minutes l'addition d'iode dans l'essai et dans le temoin. Ces trois minutes constitueront une marge suffisante pour effectuer le dosage par l'hyposulfite après acidification.

Calcul des résultats : Si N est le nombre de cm³ d'hyposulfite 0,005 N versés à la suite du tirage de l'essai à blanc, et n celui qui est relatif à l'essai réel, la quantité de lactose en gr. par litre sera donnée par la formule : $(N - n) \times \frac{342}{2} \times \frac{1}{200} 10$ en lactose anhydre ; et en lactose hydraté $(N - n) \frac{360}{2} \times \frac{1}{200} 10$.

Nous avons utilisé comme méthode de contrôle la méthode de Bertrand, après défécation cadmique. Celle-ci s'effectue de la façon suivante : 4 cm³ de lait sont traités par 32 cm³ de liqueur cadmique, puis 4 cm³ de soude 1,1 N. On porte à 100 cm³, puis on filtre. On prélève 20 cm3 de filtrat sur lesquels on pratique le dosage du lactose selon la classique méthode de Bertrand.

D'autres fois, dans le but de réduire la prise d'essai, la déprotéinisation a été conduite sur 0,75 cm³ de lait auxquels on ajoute 1 cm³ de réactif cadmique, puis 0,80 cm³ de soude, 1,1 N ou 3,2 cm³ de soude 0,275 N. On filtre dans un ballon jaugé de 15 cm³, on lave le précipité, puis on transvase dans un erlenmeyer en lavant le ballon de façon à obtenir un volume de 20 cm³. On effectue le dosage d'après la méthode de Bertrand.

Le tableau V montre que l'un ou l'autre des procédés de défécation, appliqué à la méthode de Bertrand, conduisent à des résultats équivalents.

TABLEAU V. — *Comparaison entre les résultats obtenus sur le même lait après défécation cadmique à l'aide de la méthode de* Bertrand.

Laits	BERTRAND (défécation sur 0,75 cm³ de lait)	BERTRAND (défécation sur 4 cm³ de lait)
13	56	56,5
14	60.3	60
15	58.5	58.3
16	61	61.2
17	62	62

Nous avons comparé ces résultats avec ceux que donnent sur le même lait la méthode de BERTRAND et la technique que nous proposons :

TABLEAU VI. — *Comparaison entre les résultats obtenus sur le même lait après défécation cadmique respectivement à l'aide de la technique proposée et avec la méthode de* BERTRAND.

Laits	Technique proposée (iodométrie)		Méthode de BERTRAND (défécation sur 4 cm³)
18	42.2	42.2	44
20	56.2	56.2	58
19	65.8	65.6	67.2
21	59	59.4	60.9
22	67	68.4	69.5
23	64.1	64.8	66
24	49.6		52
25	67.5	68	69.8

De l'examen des tableaux V et VI, il ressort que les valeurs trouvées à la suite des dosages du lactose sur un même lait, d'une part au moyen de la microméthode iodométrique de DUMAZERT, précédé de la défécation cadmique, et d'autre part d'après la méthode de BERTRAND, choisie comme méthode de référence, présentent un accord satisfaisant. Ceci justifie donc l'emploi de la déprotéinisation cadmique. Remarquons en outre que la technique que nous proposons permet de réduire la prise d'essai à 0,1 cm³ de lait, ce que M. HUSSET-BIERRY n'avait pas cherché à réaliser lorsqu'elle a proposé d'appliquer la méthode iodométrique de DUMAZERT au dosage du lactose après une déprotéinisation mercuro cadmique portant sur 1 cm³ de lait. Enfin, il est à peine utile de souligner que la déprotéinisation cadmique présente sur la désalbumination mercurocadmique l'avantage d'un mode opératoire simplifié. On remarquera toutefois que, d'une façon systématique, les résultats obtenus par la méthode iodométrique sont légèrement plus faibles que ceux auxquels conduit la méthode de BERTRAND. En cela, nos résultats sont en accord avec ceux de M. BIERRY (20), (104), et nous devons nous ranger aux conclusions de cette dernière, à savoir que certaines substances glucidiques sont appréciées par le procédé de BERTRAND alors qu'il semble que la méthode iodométriques n'en tienne pas compte.

III. — MICRODOSAGE DES CHLORURES DU LAIT

Quelles techniques pouvons-nous adapter éventuellement au dosage du chlore dans le lait de femme pour des quantités de l'ordre de 0,1 cm^3 ? Nous envisagerons à cet effet les méthodes qui ont été préconisées en général pour la détermination des chlorures dans le lait humain.

Nous réserverons un paragraphe consacré à l'étude des méthodes utilisant la minéralisation des matières organiques.

Parmi les méthodes pratiquées sur le lait de vache, nous distinguerons les techniques dosant le chlore en milieu neutre d'une part, en milieu acide d'autre part. Deniges (53), après désalbumination au métaphosphate de soude, ajoute un volume déterminé de nitrate d'argent et dose en retour par le sulfocyanure de potassium en présence d'alun ferrique. Fleury (77) déprotéinise le lait au ferrocyanure de zinc (Carrez) et adapte au lait la technique de Foulcry (86), application de la méthode Votocek (236) de titrage de l'ion chlore dans l'urine, dont voici le principe : en présence de nitroprussiate de sodium et de sulfate mercurique, l'ion chlorhydrique du lait se combine au mercure en donnant du chlorure mercurique. Quand il n'y a plus de chlore libre, le moindre excès d'ion mercure donne un précipité de nitroprussiate mercurique qui produit un louche persistant. C'est le même principe de dosage mercurimétrique qui inspire la méthode de Raffaelli (180) mais cet auteur utilise la désalbumination acétique.

Van den Burg et Koppejan (225), après précipitation des protéines par l'acide azotique, dose les chlorures du filtrat par la méthode de Charpentier-Volhard. Raquet et Kerleveo (181) diluent 10 cm^3 de lait, le déprotéinisent au ferrocyanure de zinc (Carrez) et dosent les chlorures de filtrat par cette même méthode.

Sharp et Struble (211) titrent directement les chlorures du lait par la méthode de Mohr. Ils recommandent de ne pas dépasser 2 cm^3 de la solution de chromate de potassium à 10 p. 100 utilisée comme indicateur, sinon l'on risque de commettre une erreur par défaut.

Sanders (203) estime que la méthode de Mohr, avec le chromate de potassium comme indicateur, donne lieu, même avec un facteur de correction, à des résultats trop élevés et variables. L'emploi de la dichlorofluorescéine comme indicateur, donne des chiffres moins forts mais encore trop élevés et trop variables ; les

sources les plus importantes d'erreurs sont des points de changement de coloration indistincts avec les deux indicateurs et l'absorption de l'argent par la protéine.

Massot et Lestra (138) préconisent l'alcool-acétone comme défécant. Ils opèrent sur 10 cm³ de lait, ajoutent un volume connu de nitrate d'argent dont ils dosent l'excès par le sulfocyanure de potassium.

Signalons le procédé de Sanders (202) qui supprime la déprotéinisation et la minéralisation : à 10 cm³ de lait, on ajoute une quantité déterminée (généralement 15 cm³) d'une solution spéciale 0.0291 N de nitrate d'argent contenant 4,944 g. de nitrate d'argent, 200 cm³ d'acide nitrique concentré, 300 cm³ d'une solution saturée de sulfate ferrico-ammoniacal qui sert d'indicateur, et de l'eau distillée pour compléter le volume à 1.000 cm³. On ajoute 100 cm³ d'eau, on titre immédiatement avec une solution de sulfocyanure de potassium 0,0291 N (2,828 g. par litre). Le nombre de centimètres cubes de solution nitro-argentique, moins la valeur fournie par le titrage multiplié par 0,01 est égal au pourcentage des chlorures. On peut seulement se demander si tous les chlorures sont ainsi dosés.

Paccard (156) a recherché la valeur critique de différentes méthodes qu'il expérimente sur le lait de femme. Il applique notamment la déprotéinisation à l'hydrate d'aluminium (Hansweiss), et dose les chlorures par la méthode de Mohr qu'il rejette, ou par celle de Charpentier-Volhard. Il repousse la méthode de Deniges exposée plus haut, lui reprochant une filtration trop longue et l'addition d'un liquide albumineux présenté par Deniges comme une amélioration et qui rend le dosage encore plus difficile (v. p. 42). Avec Marceau et Revol (136), il recommande par contre le dégraissage préalable du lait avec le galactimètre d'Adam sur le lactoplasma dilué. Ces auteurs pratiquent la déprotéinisation préconisée par Piettre (165) pour le dosage de la caséine. Il termine par la méthode de Charpentier-Volhard. (Deniges).

CHOIX DES TECHNIQUES.

Nous ne reprendrons pas les critiques formulées par Paccard contre les méthodes qu'il a expérimentées sur le lait de femme. Nous ne retiendrons en général aucune de ces techniques parce que toutes les déprotéinisations employées conduisent à des dosages entachés d'erreur par défaut, tout le chlore organique n'étant pas totalement présent dans le filtrat.

Plus rationnelles nous paraissent les méthodes faisant appel à une minéralisation précédant le dosage.

Parmi les macrométhodes de ce groupe, on peut classer celles qui utilisent la calcination simple et celles qui emploient la minéra-

lisation permanganique. CHARPENTIER et VOLHARD (in 53) détruisent les matières organiques par calcination simple. Les cendres sont reprises par l'acide nitrique. Nous nous accorderons avec PACCARD pour reconnaître que, même en conduisant au-dessous du rouge sombre la calcination, on n'est jamais absolument sûr de ne pas volatiliser une partie des chlorures.

En 1932, DAVIES (48) a préconisé la méthode suivante : à 10 cm³ de lait, on ajoute 10 cm³ d'une solution 0,05 N de nitrate d'argent, 2 cm³ d'une solution de permanganate à environ 6 p. 100, et 10 cm³ d'acide nitrique concentré. On chauffe jusqu'à ce que le liquide devienne limpide et qu'un faible précipité se dépose au fond en même temps que des vapeurs brun-rougeâtre se dégagent, ce qui demande environ 3 à 4 minutes. A ce moment, on ajoute 0,25 g. d'urée, et on dilue à 100 cm³ environ. On verse 1 cm³ d'une solution saturée d'alun ferrique dans de l'acide nitrique à 10 p. 100. On titre l'excès d'argent avec une solution de sulfocyanure de potassium 0,05 N.

PACCARD (156) a expérimenté la méthode à minéralisation permanganique indiquée par LAUDAT pour le chlore sanguin, sur le lait de femme, méthode dont il cite de nombreuses et légères modifications (ZARIBNICKY) (242), (MUNCHBERG) (151), (NESENI) (153), (MASSOT et LESTRA) (138). MASSOT et LESTRA minéralisent, par une solution saturée de permanganate, les matières organiques de 10 cm³ de lait de vache ; ils précipitent les chlorures en milieu nitrique par un volume connu et en excès de nitrate d'argent. La minéralisation se fait en ajoutant du permanganate pendant tout le temps de l'ébullition. Après refroidissement et addition d'éther on titre par sulfocyanoargentimétrie. Ils recommandent d'introduire la liqueur argentique avant addition de permanganate, l'oxydation pouvant entraîner des pertes de chlore gazeux s'il n'y a pas d'argent pour fixer cet halogène ; il est important également pour la netteté du virage de verser le sulfocyanate sur les liqueurs refroidies. L'excès de permanganate était réduit par du glucose. On a préconisé l'emploi de nitrite de sodium ou d'eau oxygénée, mais ces réactifs n'atteignent jamais le degré de pureté du glucose, en particulier l'eau oxygénée qui est souvent souillée de traces de chlorures. Cette technique est excellente et rapide ; celle que nous adopterons pour le lait de femme sera d'ailleurs basée sur le même principe. Envisageons maintenant les méthodes microanalytiques :

SJOLLEMA (214) a également utilisé la minéralisation sur 2 cm³ ou même sur 1 cm³ de lait avec 2 cm³ de permanganate, et la méthode de CHARPENTIER-VOLHARD pour doser les chlorures. Pour une prise d'essai encore plus modeste, il est indispensable d'adopter un protocole expérimental un peu spécial.

Tout récemment, en 1941, RADU VLADESCO (235) appliquait au

lait le principe de la microsédimentation qu'il avait exposé l'année précédente. 0,1 cm^3 de lait additionné d'un excès de nitrate d'argent est mis à minéraliser par chauffage dans un ballon KJELDAHL avec de l'acide azotique concentré. Quand le contenu du ballon est devenu tout à fait clair et après refroidissement, on ajoute un excès d'ammoniaque afin de dissoudre complètement le chlorure d'argent. Par centrifugation, on débarrasse le liquide des corps précipitables en milieu ammoniacal, et on le décante dans un tube à sédimentation : ce dernier est un tube à centrifuger en verre Pyrex conique, au sommet duquel on a soudé un capillaire cylindrique ayant une lumière uniforme de quelques dixièmes de millimètre. Le tube capillaire, après avoir été rempli avec de l'eau distillée, est fermé à son extrémité libre avec un peu de cire (fondue à la flamme d'une veilleuse). Dans ce tube ainsi préparé et préalablement étalonné à l'aide de solutions titrées de chlorure de magnésium, on introduit ensuite un excès d'acide azotique concentré goutte à goutte jusqu'à réaction nettement acide pour reprécipiter le chlorure d'argent, et on centrifuge sous la vitesse et pendant la durée adoptées lors de l'étalonnage du tube à sédimentation.

L'auteur signale qu'il y a lieu de prendre les précautions suivantes : 1° Les tubes doivent être bien propres afin d'empêcher l'adhérence du chlorure d'argent aux parois ; 2° Le capillaire ne doit pas contenir de bulles d'air dont la présence empêcherait la sédimentation régulière.

Ces détails, auxquels il faut ajouter le débouchage du capillaire à l'aide d'un mince fil de tungstène, le nettoyage du tube avant et après centrifugation avec de l'ammoniaque (pour dissoudre le précipité de chlorure d'argent) et ensuite de l'eau distillée, constituent de sérieuses complications opératoires.

RUSZNIACK (in 187) a proposé pour le microdosage du chlore sanguin une technique qui fait appel à des prises d'essai n'excédant pas 0,1 cm^3. Il dose l'excès de nitrate d'argent, non par du sulfocyanure de potassium, mais par du sulfocyanure d'ammonium. C'est la microméthode que nous avons essayé d'adapter au lait de femme.

DESCRIPTION DE LA METHODE

Les réactifs nécessaires sont les suivants : solution centinormale de nitrate d'argent, solution centinormale de sulfocyanate d'ammonium, solution saturée à froid d'alun de fer ammoniacal, acide nitrique à 40° Beaumé exempt de chlore, solution saturée à froid de permanganate de potassium et glucose pur en poudre.

Nous avons utilisé une capsule en porcelaine, de 25 cm^3, munie d'un manche en bois, qui permet une manipulation beaucoup

plus pratique, et un rectangle de grille roulée en cylindre comme support de la capsule, afin d'obtenir un chauffage extrêmement doux.

Le mode opératoire est le suivant :

1er *temps. Minéralisation.* — Dans la capsule on verse 0,1 cm³ de lait mesuré avec soin avec une micropipette que l'on rince trois fois à l'eau distillée. On laisse écouler lentement le liquide. On ajoute, avec une pipette exactement étalonnée, 2 cm³ de nitrate d'argent N/100, puis 10 gouttes d'acide nitrique pur. On porte à l'ébullition avec la veilleuse d'un bec Bunsen, de façon à ne pas avoir de pertes, en agitant constamment avec une petite baguette de verre. Quand l'ébullition s'est installée, on verse goutte à goutte la solution saturée de permanganate jusqu'à coloration rose persistante. On ajoute une pincée de glucose pour décolorer l'excès de permanganate.

2e *temps. Titrage.* — On laisse refroidir, on ajoute trois gouttes de solution saturée d'alun de fer ammoniacal. Et l'on titre au moyen d'une solution N/100 de nitrate d'argent que l'on verse à la microburette jusqu'à coloration légèrement brique.

Calcul des résultats. — Soit n le nombre de cm³ de sulfocyanure d'ammonium N/100 versés pour obtenir le virage, le poids p de chlorure exprimé en milligrammes de chlorure de sodium contenus dans la prise d'essai, sera donné par la formule :

$$p = (2 - n)\ 0{,}585$$

Le poids P exprimé en grammes par litre de lait sera : $P = 10\ p = (2-n)\ 5{,}85$.

L'application de cette technique donne lieu aux remarques suivantes :

La minéralisation doit être conduite, ainsi que nous l'avons recommandé, avec beaucoup de précautions en agitant constamment de façon à éviter les projections. Elle exige beaucoup plus de permanganate que pour le sang. Ruszniack emploie 10 à 12 gouttes de ce réactif pour le sang. Pour le lait, il en faut un minimum de 4,4 cm³ et un maximum de 4,7 cm³. Cette différence est due à l'énorme proportion de glucides et de lipides que renferme le lait, alors que le sang ne contient que 1 gr. de substances réductrices libres. De ce fait, la minéralisation est un peu plus longue, et demande 10 à 15 minutes, tandis que pour le sang 5 minutes environ suffisent. D'autre part, pour la réduction de l'excès de permanganate, l'opération est également plus longue, il faut attendre assez longtemps avant d'ajouter une nouvelle pincée de glucose qui peut ne pas être indispensable, la réduction de l'excès de permanganate étant souvent tardive. On saisira le virage assez commodément si l'on se place bien à la lumière sur fond très blanc ; la coloration

légèrement brique tranchera alors très distinctement. Cependant divers manipulateurs peuvent noter ce virage pour des valeurs assez différentes du volume de la solution 0,01 N de sulfocyanure versé au cours d'essais par ailleurs identiques. Pour éliminer ce facteur personnel, il est bon de l'intégrer dans le calcul même des résultats ; aussi commencera-t-on par déterminer les coefficients des solutions 0,01 N de sulfocyanure (soit s) et de nitrate d'argent (soit a) par la manipulation ci-dessous :

1° Prélever 2 cm³ exactement mesurés de la solution 0,01 de nitrate d'argent dans la petite capsule de porcelaine de 30 cm³ environ. Ajouter 4 à 5 cm³ d'eau distillée puis X gouttes d'acide nitrique pur et III gouttes de la solution saturée d'alun de fer et d'ammonium. Titrer au moyen de la solution 0,01 N de sulfocyanure versée à l'aide de la microburette jusqu'à soloration rose très pâle et persistant une minute. En répétant ce titrage, on doit obtenir des résultats comparables à 0,01 cm³ près. On prendra la moyenne de 3 essais remplissant cette condition : soit N cm³ de solution 0,01 de sulfocyanure. On peut donc poser :

$$2\ a = N.s$$

2° Prélever 1 cm³ exactement mesuré d'une solution étalon de chlorure de potassium 0,01 N dans la petite capsule blanche et diluer avec 4 cm³ d'eau distillée environ. Ajouter X gouttes d'acide nitrique pur, puis 2 cm³ de la solution titrée de nitrate d'argent 0,01 N. Doser l'excès de nitrate d'argent au moyen de la solution 0,01 N de sulfocyanure au moyen de la microburette et en présence de III gouttes de la solution saturée d'alun de fer et d'ammonium comme précédemment. Répéter cette opération jusqu'à obtention de trois essais ne différant pas de plus de 0,01 cm³ de sulfocyanure. Prendre la moyenne de ces trois essais ; soit n cm³ de solution 0,01 N de sulfocyanure. Nous pouvons écrire :

$$(2\ a - (n.s) = 1$$

Les coefficients a et s s'obtiendront par la résolution du système suivant :

$$2\ a = N.s \qquad I$$
$$2\ a - (n.s) = 1 \qquad II$$

d'où il suffira de tirer s coefficient de la solution de sulfocyanure, la connaissance de celui de la solution de nitrate d'argent (a) ne présentant aucun intérêt, puisque l'on utilisera le même volume (2 cm³) de cette solution dans tous les dosages, et que l'on sait que ce volume correspond à N cm³ de la solution de sulfocyanure. Calculons donc s en portant la valeur de $2a$ dans l'équation II :

$$(N.\ s) - (n.\ s) = 1$$

$$\text{d'où } s = \frac{1}{N\text{-}n}$$

Ces manipulations préliminaires permettent de bien s'exercer à l'appréciation correcte du virage et de contrôler périodiquement les réactifs titrés 0,01 N qui s'altèrent assez rapidement.

Voici les résultats que nous avons trouvés, en prenant la méthode de LAUDAT, citée plus haut, comme méthode de référence.

TABLEAU VII. — *Valeurs des chlorures (en gr. pour 1.000 cm³) déterminées sur différents laits de femme par la méthode de* LAUDAT *et la microméthode proposée.*

Laits	Technique proposée		Méthode de LAUDAT
26	1.25	1.25	1.26
27	1.51	1,49	1.50
28	1.41	1.38	1.41
29	1.20	1.20	1.19
30	1.49	1.46	1.48
31	1.36	1.38	1.35
32	1.40	1.43	1.45

D'après les chiffres exposés dans ce tableau, nous pouvons constater que cette méthode est fidèle.

La différence entre deux essais du même lait ne dépasse pas 0,03 %; c'est-à-dire que l'erreur commise est inférieure à 2 p. 100 environ, et que, par rapport à la macrométhode, la technique de RUSZNIACK, appliquée au lait de femme, donne une approximation très suffisante.

Pratiquée avec les précautions indiquées, cette technique constitue donc une adaptation parfaite au lait de femme et permet de bénéficier des avantages inhérents à la pratique de la détermination des chlorures sur une prise d'essai réduite à 0,1 cm³.

IV. — MICROSOSAGE DES PROTEINES TOTALES DU LAIT

« Le total des protides donnant la valeur alimentaire du lait en substance quaternaires, le dosage total des protides est bien préférable à la seule détermination de la caséine (cité in Paccard (156).

D'ailleurs le dosage de la « caséine » du lait de femme semble bien arbitraire. Tout ce qu'on peut affirmer, c'est que chaque fois qu'une méthode prétend évaluer le taux de caséine, elle n'apprécie qu'une partie des protéines totales. Et l'importance de cette fraction varie d'ailleurs avec le réactif précipitant utilisé. Quel moyen de contrôle possède-t-on ? La présure donne de bons résultats avec le lait de vache et conduit à des filtrats louches avec le lait de femme.

Dans une intéressante conférence parue en 1929, le Professeur Charles Porcher (174) expose clairement les raisons de cette difficulté du lait féminin à coaguler. La diminution du taux de protéines (10-11 au lieu de 33-35 gr. par litre) suffit à elle seule à faire comprendre l'absence de toute coagulation. En diminuant le lait de vache avec 2 ou 3 volumes d'eau, la liqueur obtenue ne donnent que des flocons qui se soudent difficilement. En second lieu, la forte proportion de globulines qui caractérise le lait de femme explique le rôle protecteur antilab que joue cette protéine à l'état de globulinate, vis-à-vis de la caséine. La réaction du milieu trop alcalin n'est pas favorable à l'action de la présure. D'autre part la présence de ferments antilab aurait une influence certaine. Enfin, il ne faut pas oublier que le lait humain renferme en moyenne 3 gr. 50 de matières minérales par litre pour 9 gr. 50 dans le lait bovin, soit environ trois fois moins. La diminution de la chaux, aussi bien de la chaux soluble que du calcium colloïdal, et la pauvreté en acide phosphorique seraient ainsi en grande partie responsables de cette difficulté de coagulation.

En effet, Porcher et Mlle Brigando (175) ont préparé à partir de caséine du lait de vache, une sorte de lait de femme artificiel ayant une teneur comparable en protéines, dans lequel le pH a été ramené à 7,25 — 7,30 et dont le taux de cendres a été rabaissé considérablement, sous la forme de chlorure de calcium seulement. Ce lait humanisé synthétique ne coagulait plus.

Cependant Wang et Vood (237) prétendent doser la caséine humaine par une suspension de 33 mmg. de présure dans 1 cm³ d'acide chlorhydrique N pour 100 cm³ de lait à 38°C pendant 15 à 30 minutes, le pH optimum étant de 4.97.

Les réactifs chimiques donnent d'aussi mauvais résultats :

D'après Schmidt (in 173), il suffit de chauffer à 40°C en faisant passer de l'acide carbonique pour obtenir la précipitation de la caséine.

Pfeiffer (in 173) emploie l'acide chlorhydrique, dont il détermine empiriquement la quantité avant chaque opération.

Dogiel (in 173) emploie pour 100 cm³ de lait 20 cm³ d'acide chlorhydrique N/10.

L'acide trichloracétique est à rejeter : il redissout en partie la caséine. L'acide acétique présente les mêmes inconvénients : il est difficile de déterminer le pH exact où la précipitation est totale. Trop peu de ce réactif donne une floculation incomplète et une quantité trop forte en insolubilise une partie. Mlle Peyrot (164) a cependant adopté ce réactif. Elle ajoute à 5 cm³ de lait de femme 3-4 cm³ d'acide acétique 0,1 N. Elle complète à 25 cm³, puis place, après agitation, deux ou trois heures à 3°C, et ensuite au bain-marie à 40°C pendant quelques minutes. Elle prétend obtenir une précipitation complète et un filtrat limpide. Nous comprenons qu'il soit difficile d'indiquer la quantité exacte d'acide acétique à verser, le taux de caséine étant variable, mais la marge de 3 à 4 cm³ est bien grande. Mlle Peyrot dit bien que l'on doit ajouter cet acide jusqu'à apparition de gros flocons. Nous avouons nous être livré à cette opération dans les conditions précisées par cet auteur et nous devons signaler qu'il est bien difficile d'apprécier exactement l'instant où la quantité juste suffisante d'acide acétique a été ajoutée ; nous n'avons jamais pu réussi à obtenir par ce procédé ni une précipitation complète, ni un filtrat clair.

Plus logique est Demuth (51), qui détermine le pH exact de floculation optima de la caséine : c'est en se plaçant entre les pH 4.63 et 4.65, à l'aide d'un mélange tampon d'acide acétique et d'acétate de sodium à des normalités convenables, dont il fait varier les proportions respectives, qu'il obtient les filtrats les plus clairs.

S'appuyant sur cette notion, Moreno-Martin (148) tamponne le lait à un pH 4,2, et également à l'aide d'un mélange acétate de de sodium acide acétique ; il porte à 37-40°c et filtre.

Patein et Deval utilisent aussi l'acide acétique. Piettre n'améliore pas cette technique en remplaçant ce réactif par l'alcool acétique.

Kobrak (114) signale une autre méthode : on dégraisse par centrifugation, puis on fixe préalablement la quantité d'acide en titrant 10 cm³ de lait jusqu'à début de rougissement du papier tournesol. Quant à l'acide à employer, Kobrak donne la correspondance de Spritzer : 10 cm³ d'acide sulfurique valent 11 cm³ 8

d'acide acétique 0,1 N. Or, en ajoutant simplement au lait écrémé la quantité déterminée d'acide quel qu'il soit, il ne remarque pas de précipitation ; en continuant l'acidification, il n'observe pas non plus de précipité, même avec un gros excès et après plusieurs jours. Il attribue cette incapacité de floculation à des substances antiprécipitantes dont il entreprend l'élimination par dialyse, d'abord avec de l'eau distillée contenant du thymol, ensuite avec de l'eau chloroformée, moyennant quoi la précipitation est possible. Voici donc le mode opératoire auquel il s'arrête : le lait, dégraissé en grande partie par centrifugation, est additionné de 1/5 de son volume d'acide acétique N/10, puis introduit dans un tube de porcelaine que l'on suspend dans de l'eau chloroformée, l'eau étant changée plusieurs fois le premier jour. Après 2 ou 3 jours, on trouve déjà du précipité au fond du tube. Après 5 à 6 jours, le maximum est atteint. L'opération est considérée comme complète quand le liquide surnageant est clair. Le contenu du tube est versé dans un tube à centrifugation. On décante le liquide surnageant, le précipité est lavé avec de l'eau légèrement acétique (quelques gouttes), puis avec de l'alcool et de l'éther, puis dégraissé complètement par extraction au Soxhlet.

C'est évidemment un mode opératoire assez compliqué, qui ne peut être pratiqué dans un dosage courant.

En réalité, le seul moyen de parvenir à un dosage correct de la caséine vraie, serait de connaître auparavant la nature exacte de cette protéine. Nous montrerons plus loin, pour le lait de vache, que le relargage par des solutions salines appropriées des protéines lactées conduit à des notions intéressantes sur l'existence de plusieurs fractions caséiques et permet l'évaluation exacte de la caséine. Nous n'avons pu expérimenter cette méthode sur le lait humain, mais il est infiniment probable que son application à cette humeur ferait considérablement progresser le problème du dosage de la caséine humaine.

Nous nous en tiendrons donc au dosage des protéines totales à l'échelle microanalytique, dosage qui, d'ailleurs, nous l'avons dit, fournit en somme des renseignements suffisants au point de vue alimentaire.

Les protéines totales sont déterminées directement ou indirectement.

La méthode volumétrique de Deniges (53) et la méthode colorimétrique de Lascar-Buruiana (36) sont dans le premier cas. Cette dernière est basée sur la réaction xanthroprotéique donnée par les protéines du lait. 1 cm^3 de lait est additionné de 6 à 7 cm^3 d'acide nitrique concentré ; après une ébullition de 2 minutes exactement, le liquide froid est neutralisé, porté à un volume connu qui ne doit pas renfermer plus de 70 mmg. p. 100 de matière pro-

téique, et rapidement examiné au colorimètre en comparant la teinte obtenue avec celle que donne une solution étalon ; celle-ci est composée de 1,6 cm³ de bichromate de potassium, 2,70 cm³ de permanganate de potassium N/100, en complétant le volume à 100 cm³ avec de l'eau distillée.

La méthode de DENIGES repose sur l'insolubilisation par l'iodure mercurico-potassique en milieu légèrement acétique des albumines qui entraînent avec elles en combinaison une partie du mercure de ce réactif. Le mercure résiduel est dosé par cyanoargentimétrie. Un tableau établi par DENIGES permet de connaître la correspondance entre le mercure et les protéines précipitées.

MERCIER (in 53) précipite 10 cm³ de lait par 100 cm³ d'alcool à 0°c additionnés de deux gouttes d'acide acétique. Après repos, filtration et dégraissage du précipité, il pèse.

La méthode de VLADESCO (234) n'exige pas non plus une destruction des substances organiques. Voici la technique utilisée pour le lait de femme : sur un papier filtre sans cendres, on étale de 2,5 à 5 cm³ de lait. Après l'évaporation complète de l'eau à 100-103°C, on extrait les lipides avec de l'éther sulfurique et les substances solubles par un épuisement dix fois répété, au moyen de 10-20 cm³ chaque fois d'une solution d'acide acétique 0,01 N Les protides restent seuls fixés au papier filtre. On verse sur ce dernier une dizaine de gouttes d'une solution d'acétate de magnésium à 20 p. 100. On dessèche au bain-marie et on incinère. Les cendres blanches sont dissoutes dans 10 cm³ d'acide sulfurique à 20 p. 100 et dans cette solution on dose l'acide phosphorique par la méthode colorimétrique de BRIGGS. Cet auteur prétend ainsi doser la caséine. Bornons-nous seulement à remarquer que cette protéine n'est pas la seule dans le lait à renfermer du phosphore : pour 0.84 (HAMMARSTEN) ou 0.71 p. 100 (VAN SLYKE) qui se trouvent dans la caséine, VAN SLYKE fixe à 0.24 le pourcentage de phosphore que renferme la lactoglobuline.

Le deuxième groupe de méthodes fait appel à une précipitation préalable des protéines du lait ; on évalue ces dernières par différence entre les résultats trouvés après dosage de l'azote non protéique du filtrat et ceux qui sont obtenus après minéralisation du lait total.

La question du déprotéinisant prend évidemment alors une grosse importance. Il n'est pas indifférent en effet que le filtrat contienne de l'azote protéique. Un procédé de défécation imperméable aux protéines est donc nécessaire.

MERCIER (in 53), après déprotéinisation à l'alcool acétique, propose aussi de doser l'azote du filtrat.

L'acide métaphosphorique d'après Mme PEYROT, ni l'acide

trichloracétique qui conduit à des filtrats albumineux, ne sont à recommander pour le lait de femme. Cet auteur a choisi le phosphotungstate de soude, elle propose les proportions suivantes :

Lait	1 vol.
Solution de phosphotungstate de sodium à 10 p. 100	1 vol.
Eou distillée	2 vol.
Solution 2N/3 d'acide sulfurique	1 vol.

L'azote total est déterminé sur 0.5 cm³ de lait.

La minéralisation est opérée avec 3 cm³ du mélange destructeur :

Acide sulfurique pur	25 cm³
Sulfate de cuivre crist. et pulv.	1 gr.
Sulfate de potassium crist. et pulv.	1 gr.

La distillation est effectuée au moyen de l'appareil de Parnas et Wagner.

A ce propos, notons que Sirks (213) a déconseillé l'emploi du sulfate de cuivre comme catalyseur dans la microméthode de Kjeldahl, rendant ce corps responsable de résultats trop bas. Il précise par contre que l'addition d'une goutte infime de mercure vient remédier à ce défaut.

Paccard (156) ne se préoccupe pas de l'azote non protéique et dose l'azote total sur 1 cm³ d'une dilution au 1/10 de lait, ajoute 0.50 gr. d'un mélange minéralisateur :

Sulfate de suivre	1 gr.
Sulfate de potassium	40 gr.

puis il verse 1 cm³ d'acide sulfurique pur et il opère comme Mme Peyrot.

Outre la source d'erreur que constitue le fait de ne pas tenir compte de l'azote non protéique du filtrat, ce procédé nous paraît présenter le défaut d'opérer sur une prise d'essai vraiment trop faible qui nécessiterait l'emploi du submicrokjeldhal (62 bis). 0,1 cm³ de lait correspond en effet à un maximum de 0 mmg. 200 d'azote. Or le microkjeldhal simple n'est vraiment précis qu'aux environs du milligramme. Par ailleurs, l'usage du submicrokjeldhal est d'une application excellente mais d'une manipulation trop délicate pour qu'on puisse songer l'utiliser dans une méthode courante de laboratoire.

De cette rapide revue, il ressort que le microdosage des protéines totales du lait doit être effectué par la méthode de microkjeldahl. On devra tenir compte de l'azote total non protéique et le déduire de l'azote total. Ce dernier sera dosé après minéralisation sulfurique de 0,3 cm³ de lait. Par ailleurs, on dosera l'azote total non protéique après déprotéinisation du lait. L'agent de défécation qui nous a paru le plus convenable est l'hydrate de

cadmium. Tous les dosages sont effectués à la suite de la distillation de l'ammoniac résultant des minéralisations au moyen de l'appareil de PARNAS et WAGNER.

Avec une pipette de 0,5 cm³ graduée en demi-dixièmes, on mesure 0,3 cm³ de lait que l'on introduit dans un petit tube à essai de 5 cm. de longueur, muni d'un bec. On ajoute 4 cm³ de solution cadmique et 0,5 cm³ de soude 1,1 N après agitation.

On filtre directement dans un matras-kjeldahl à col long pour la détermination de l'azote non protéique. On lave le contenu du filtre à plusieurs reprises à l'eau distillée. On prépare un essai témoin contenant le filtrat d'une défécation pratiquée à blanc, en remplaçant le lait par un égal volume d'eau.

Le filtre qui contient l'hydrate de cadmium ayant entraîné les protéines est introduit dans un autre matras. Il représente l'azote protéique. Dans ce cas, l'essai témoin peut être constitué par le précipité cadmique de la défécation à blanc effectuée plus haut.

Dans un matras, on mesure 0,3 cm³ de lait pour l'évaluation de l'azote total. On fait un témoin avec 0,3 cm³ d'eau distillée. On verse dans chacun des ballons 3 cm³ d'acide sulfurique pur et une pointe de canif du catalyseur de minéralisation de DUMAZERT et MARCELET (¹).

On porte les six matras à feu doux pendant 15 à 30 minutes, on surveille attentivement, car les matières grasses contenues dans le lait de femme provoquent une mousse abondante qui risque de faire déborder les ballons. On a introduit, afin de régulariser l'ébullition, une bille en verre dans chaque matras. On augmente progressivement l'intensité de la flamme quand la mousse a cessé de se former.

Dans le milieu limpide et incolore, c'est-à-dire au bout d'une heure et demie environ, on laisse refroidir, on rince les parois avec un jet de micropissette, puis on distille au microkjeldahl, méthode trop classique pour que nous la décrivions. On recueille l'ammoniaque formée dans 10 cm³ d'acide sulfurique N/70. On titre l'excès d'acide sulfurique non combiné, en présence de rouge de méthyle, par la soude N/70 dont la correspondance a été vérifiée préalablement sur l'acide sulfurique, au moyen d'une burette de 10 cm³ graduée au demi-dixième et pourvue d'un bec effilé. Précisons qu'il convient, ainsi que l'a montré NICLOUX (154), de chasser l'acide carbonique par une ébullition préalable, que l'on répète au milieu du dosage, puis à la fin, au moment où le contenu de

(¹) Catalyseur de minéralisation de DUMAZERT et MARCELET (66) :

Sélénite de mercure	1 gr.
Sulfate de potassium	24 gr.

l'erlenmeyer devient orangé. On refroidit sous un courant d'eau, et l'on termine le dosage.

3° *Calculs.* — Soit n le nombre de cm^3 versés, soit t le volume de soude nécessaire pour le témoin correspondant, la différence $t - n$ multipliée par 0,2 donne la quantité d'azote contenue dans la prise d'essai.

Le tableau ci-dessous montre les résultats obtenus au moyen de ces déterminations.

TABLEAU VIII. — *Valeurs comparées de l'azote protéique et de l'azote non protéique à l'azote total, contenues dans la prise d'essai (0,3 cm^3).*

Laits	Azote protéique A	Azote non protéique B	Azote total dosage direct	Azote total somme de A + B
33	0.650	0.216	0.866	0.866
34	0.768	0.136	0.894	0.904
35	0.691	0.199	0.887	0.890

Nous nous sommes entouré de tous les moyens de contrôle : témoin correspondant à chaque essai, azote total, azote protéique, azote non protéique. Nous avons essayé de voir si la somme azote protéique + azote non protéique était bien identique aux résultats donnés par le dosage de l'azote total sur le lait entier. Nous avons constaté qu'on retrouvait cette identité avec une approximation inférieure à 1 p. 100.

Ces garanties ainsi obtenues, nous pouvons donc affirmer qu'il est parfaitement légitime de doser l'azote total protéique après minéralisation du précipité cadmique.

Il est bien évident qu'un aussi grand nombre de dosages, effectués uniquement dans un but de contrôle, est inutile dans la pratique : il suffit d'estimer l'azote protéique, ce qui permet de calculer les protéines totales.

Nous avons donc proposé l'application à des quantités minimes de lait d'une méthode courante mais précise, le microkjeldahl, après défécation cadmique.

Nos résultats montrent que l'on peut en toute sécurité, au moyen de cette technique, procéder à l'estimation rigoureuse des protéines totales.

V. — MICRODOSAGE DE L'EXTRAIT SEC ET DES CENDRES DU LAIT

Nous n'avons pas eu la prétention de proposer des méthodes particulières pour doser l'extrait et les cendres sur le lait de femme. Nous avons seulement voulu montrer qu'on pouvait les évaluer sur très peu de lait par des méthodes courantes.

Extrait sec

Certains le pratiquent à chaud, d'autres le font à froid. La méthode du laboratoire de Paris en 1884 préconisait la technique suivante : mesurer 10 cm^3 de lait dans une capsule de platine à fond plat de 70 mm de diamètre qui sera maintenue huit heures à 95°C sur un bain-marie bouillant. On pèse la capsule après un séjour dans un exsiccateur à acide sulfurique.

La methode officielle française (144) utilise une capsule de 70 mm de diamètre et de 20 mm de hauteur ; on chauffe 7 h. au bain marie. Le Formulaire des hopitaux militaires (84) recommande l'usage d'une capsule de dimensions telles que 10 cm^3 forment une couche de 1 cm d'épaisseur. Deniges (53) ajoute 2 à 3 gouttes d'acide acétique cristallisée ou 4 cm^3 d'acétone ; il chauffe légérement en agitant le milieu jusqu'à commencement de coagulation, avec un agitateur en verre qui est rincé ensuite au moyen de quelques gouttes d'alcool reçues dans la capsule. Celle-ci est portée à l'étuve à eau bouillante jusqu'à poids constant.

D'après Hinard (in 53), l'extrait se fait très bien en évaporant 10 cm^3 de lait après addition de V à VI gouttes d'acide acétique à 15 p. 100 et de III gouttes de formol. On laisse 7 heures au bain marie bouillant, on pèse, en déduisant du résultat trouvé 0,01, pour compenser la surcharge occasionnée par les réactifs.

D'autres techniques permettent d'opérer à froid.

D'après le procédé Peter (in 53), on plie en huit des filtres de 3,5 cm de rayon ; sur le filtre plié, on pratique une incision suivant un des rayons allant de la circonférence presque jusqu'au centre. Après une dessication de plusieurs jours, on les tare. Sur les filtres dépliés sur un verre de montre, on verse 5 cm^3 de liquide, on dessèche en évaporant sous vide sulfurique pendant 24 heures, puis on pèse.

Pour le lait de femme, Deniges recommande, en raison de sa pauvreté en caséine, de porter directement à l'étuve sans ajouter de l'acide acétique, mais de faire avec un agitateur une ouverture dans la croûte boursouflée qui a pris naissance lorsque le lait est à peu près desséché.

C'est ainsi que PACCARD (156) procède : il perce à divers endroits la pellicule boursouflée avec un fil de platine, il laisse évaporer 7 h.

Nous n'avons trouvé que deux références bibliographiques sur le microdosage de l'extrait sec : celle de IOCHELSOHN (105) et celle de CLAVERA et MORENO MARTIN (43). D'après la première, dans une capsule de 12 cm de diamètre, on introduit une rondelle de papier filtre de 11 cm et l'on verse 1 cm^3 de lait goutte à goutte sur la surface. On porte à l'étuve 10 à 12 minutes à 110°C, puis à l'exsiccateur quelques minutes. On pèse.

CLAVERA et MORENO MARTIN, avec un tube capillaire effilé dans lequel on a soufflé une ampoule, aspirent du lait en quantité arbitraire. Puis, dans le fond de la concavité de verres de montre de 14 cm de diamètre ils répartissent des gouttelettes de liquide d'environ 3 mm de diamètre. Ils reportent la pipette et son support sur la balance et déterminent ainsi le poids de lait employé. Pendant ce temps, les verres de montre ont été déposés dans l'étuve et pesés de temps en temps après refroidissement complet dans l'exsiccateur. La dessication dure 20 minutes. Après passage à l'étuve et dans l'exsiccateur, on les superpose pour la pesée, en les maintenant l'un contre l'autre au moyen d'une baguette de verre enroulée formant ressort ; les auteurs donnent ainsi un mode opératoire très précis mais qui apparaît un peu trop compliqué.

MICROTECHNIQUE PROPOSÉE

Il nous a paru plus simple et tout aussi avantageux de procéder de la façon suivante :

Sur une petite capsule en platine ou dans un creuset en porcelaine, taré au préalable, de 10 à 20 mm de diamètre, on verse 1 cm^3 ou même 0,5 cm^3 de lait.

On évapore à l'étuve à 100°. On perce la pellicule boursouflée avec un fil de platine ou un fil de fer ordinaire qu'on rince ensuite avec quelques gouttes d'alcool. Quand le poids est devenu constant, on porte à l'exsiccateur, puis on pèse, on multiplie par 1.000 et on a l'extrait sec. Le tableau ci-dessous contient les résultats obtenus avec cette technique.

TABLEAU IX. — *Valeurs de l'extrait sec, en gr. par litre, de différents laits de femme, déterminées sur 1 cm^3 de lait.*

Lait	EXTRAIT SEC	
	Premier essai	Deuxième essai
36	113	114
37	118	120
38	100	97
39	110	111

De l'examen des résultats, il ressort que la technique se révèle fidèle et que sa précision est de 1 à 2 p. 100.

Cendres

Tous les auteurs en général calcinent l'extrait sec au-dessous du rouge sombre. Deniges chauffe à la flamme d'une lampe à alcool la capsule contenant l'extrait sec, avec précaution, puis plus fortement jusqu'à combustion complète ; il achève l'incinération, soit en portant au moufle au rouge sombre jusqu'à ce que les cendres soient devenues blanches, soit en humectant de quelques gouttes d'eau le résidu refroidi puis en desséchant complètement avec précaution au-dessus de la flamme. Il porte à nouveau au rouge et répète cette dernière opération en écrasant avec une baguette de verre les petites masses charbonneuses humectées d'eau, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de points noirs dans le résidu.

Paccard (156) sur le lait de femme, incinère le résidu avec un bec Bunsen sans dépasser le rouge sombre ; pour activer l'incinération et obtenir ces cendres blanches, il humecte de quelques gouttes d'eau le résidu refroidi et dessèche soigneusement en évitant toute décrépitation. Quand la dessication est complète, il porte de nouveau au rouge, et répète l'opération précédente jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de points noirs dans le résidu.

Technique proposée

La capsule ou le creuset contenant l'extrait sec sont pris entre deux petites pinces, et portés au-dessus de la flamme veilleuse d'un bec Bunsen puis de la flamme ordinaire, en les rapprochant de plus en plus de la source de chaleur, jusqu'à ce que le résidu sec ait été porté presque au rouge.

Il reste encore du charbon non brûlé ; on verse alors quelques gouttes d'eau, et l'on triture le résidu avec une petite baguette de verre à bout aplati, puis on reporte à la flamme avec les mêmes précautions ; avec l'agitateur, on écrase les petites particules charbonneuses et l'on recommence jusqu'à ce que les cendres soient devenues complètement blanches. On laisse refroidir à l'exsiccateur, on pèse. Le poids trouvé, multiplié par 1.000, donne les cendres totales pour un litre de lait.

Cette façon de procéder offre l'avantage d'opérer sur une prise d'essai économique et de restreindre considérablement la durée des opérations : il ne faut pas plus d'une heure pour obtenir l'extrait sec, et moins de vingt minutes pour avoir les cendres. Cette détermination de l'extrait sec et des cendres sur 1 cm^3 complète heureusement notre système de microdosage, et nous permettra, comme nous l'indiquerons plus loin, de contribuer à la détection des fraudes du lait humain.

LES CENTRES DE DONNEUSES DE LAIT

ET LA DETECTION DES FRAUDES

DANS LE LAIT DE FEMME

Ce n'est pas d'aujourd'hui que l'allaitement du nourrisson au moyen d'un lait autre que celui de la mère a été utilisé ; ce n'est pas d'aujourd'hui non plus qu'ont été engagées de vives polémiques entre les partisans de l'alimentation naturelle et ceux qui voyaient dans l'allaitement « artificiel » un moyen de la remplacer.

Jean-Jacques ROUSSEAU préconise dans « L'Emile » le retour à l'allaitement maternel. C'était déjà une campagne de presse, dont les arguments n'étaient évidemment pas aussi rigoureux que les motifs qu'ont exposés les pédiâtres modernes.

Essayant d'interpréter les fièvres alimentaires du nourrisson, SCHAEFFER (204), en 1934, signale que la cause en est bien souvent due à l'emploi d'un régime artificiel ne tenant pas compte des besoins de l'enfant en eau. Ces besoins, le lait de femme, grâce à la forte dilution de ses protides, y répond parfaitement.

La même année, MOURIQUAND (149) attribue à l'allaitement artificiel la plus grande partie des déséquilibres nutritifs apparus chez l'enfant, déséquilibres se présentant sous forme de dystrophies ou de prédystrophies qui sont d'autant plus marquées, dit-il, que le lait utilisé est modifié dans un sens qui l'éloigne davantage du lait de femme. Avec l'allaitement maternel au contraire, l'équilibre nutritif fragile du nourrisson semble assuré ; l'enfant paraît protégé contre les gastro-entérites mortelles. Une dystrophie est en effet inconcevable chez l'enfant au sein d'une bonne nourrice saine et convenablement alimentée.

Dans un même ordre d'idées, ROSSIER (197) ,en 1942, expose les causes et les conséquences des carences et du déséquilibre alimentaire qui jouent un rôle capital dans les premiers mois de la vie de l'enfant. L'alimentation au lait de vache crée bien souvent un tel déséquilibre et provoque souvent une dyspepsie, véritable « maladie du lait de vache », dont les causes principales résident en particulier dans l'indigestibilité du gros caillot caséique et dans l'insuffisance de la lactalbumine. L'allaitement artificiel est selon lui responsable dans bien des cas du rachitisme : les phosphates tricalciques du lait de vache se combinent facilement avec les acides gras libérés par la digestion, réaction facilitée par l'alcalinité du lait bovin, et qui entraîne la formation de savons alcalins éliminés par les selles. Il y a là une modification du rapport CaP lourde de conséquences.

Bien des statistiques ont été dressées, attestant la supériorité de l'allaitement maternel : EXCHAQUET (73), sur 527 nourrissons dont 88 étaient nourris au sein, 269 par un régime artificiel et 170 avec une alimentation mixte, note que l'allaitement maternel vient en

premier, en ce qui concerne l'augmentation de résistance aux troubles digestifs légers ou graves et à la morbidité.

Il arrive malheureusement souvent que la mère ne soit pas en mesure de nourrir son enfant au sein pour des motifs divers ; soit parce que la fonction amoindrie ne stimule plus l'organe, soit par suite d'une déficience physiologique, les femmes ont aujourd'hui beaucoup moins de lait. D'autre part, le temps pendant lequel elles sont en mesure d'allaiter leur enfant ne dépasse souvent pas quelques semaines. Il faut enfin signaler les cas trop nombreux où, dans un souci d'esthétique déplacé, les mères se refusent à donner le sein à leur enfant, sans se préoccuper des fâcheuses répercussions possibles sur la santé du bébé. Mais la mauvaise qualité du lait maternel suffit souvent à légitimer le retour à un lait mercenaire, surtout lorsque l'on a à faire à des enfants prématurés auxquels il est particulièrement désirable de procurer du lait de femme (Lereboullet) (126). Le lait humain constitue aussi pour les enfants débiles une indication thérapeutique.

Mais comment se procurer ce lait mercenaire ? S'il est vrai que 20 p. 100 des mères n'ont pas assez de lait, par contre environ 60 p. 100 en ont trop, elles le gaspillent (M.-E. Kayser) (111). Or, souvent l'abondance de lait est héréditaire. Mme Kayser a ainsi calculé au Congrès de Gynécologie de Berlin d'octobre 1937, que les mères de 100 donneuses de lait auraient pu fournir, en supplément du lait donné à un seul enfant, 700 litres qui sont restés inutilisés. Cet état de choses rend compte de l'usage si fréquent autrefois, aujourd'hui beaucoup plus rare, de nourrices particulières attachées à l'alimentation des nourrissons dans les familles. Ces nourrices, que l'on engageait sur une apparence saine, sans examen médical bien approfondi, se révélaient parfois, faute d'avoir pris de plus sérieuses garanties, comme la source ultérieure de troubles graves chez l'enfant qui leur avait été confié.

Utiliser le surplus du lait humain provenant de cliniques d'accouchement était une solution qu'avaient déjà adoptée Mayerhof et Pribram (140), mais d'un rendement trop minime pour que le problème s'en trouve résolu. En 1903, le Docteur Chapin crée en Amérique des centres de placement familial soumis à un contrôle serré, éliminant les défauts des pouponnières, où les risques de contagion sont grands, et des nourrices isolées sans surveillance. En 1927, le Docteur Bohn (27) (28) ouvre cependant la pouponnière d'Anthony de l'Assistance Publique de la Seine, qui servit de modèle à de nombreux établissements similaires. C'est un bâtiment de cinq étages, dont trois sont consacrés au logement des nourrissons. Ceux-ci sont alimentés par dix donneuses de lait logées au rez-de-chaussée avec leur propre enfant qui est à l'allaitement mixte ; chaque femme fournit un litre environ par jour à la

pouponnière. Sur une bien plus grande échelle, s'étaient déjà fondés en Allemagne des dépôts de lait de femme. C'est en 1919 que le Docteur Marie-Elise KAYSER (111) organise à Magdeburg un centre collecteur, mais ce n'est cependant qu'en 1935 que le fonctionnement de ce genre de centres est rendu officiel. Aussi la même année est créé le centre de Pforzheim, dépendant de la Clinique Obstétricale et Gynécologique, sous la direction du Docteur FELDWEG (74). Le lait est recueilli soit à la clinique, soit à domicile. Dans le premier cas, il est payé 12 fr. 50 (1), dans le second, 10 fr. (1) seulement. La récolte et la consommation quotidienne ne se correspondant pas exactement, le lait est conservé quelques jours ; on le stérilise par la chaleur, procédé qui a été vivement critiqué par CATEL.

Dans un long article paru dans la revue LE LAIT, Mme KAYSER (112) expose en détail l'organisation de l'office collecteur du centre d'ERFURT, modèle du genre, ouvert en 1926. Le lait est recueilli au domicile des donneuses qui sont généralement mariées. Il est contrôlé par plusieurs analyses chimiques, puis stérilisé : cinq minutes à 100° suffisent, après quoi il est distribué ; le surplus est mis à la glacière à + 2°. Pour les expéditions, il est desséché à la température de 35°C sous la pression de 35 mm de mercure par le procédé de la Maison HOLLAND-MARTIN. La poudre obtenue est facilement soluble, occupe un volume réduit pratique pour les envois, qui sont faits en boîtes de fer blanc à double parois, dans les régions de l'Allemagne les plus éloignées (l'Administration des Chemins de Fer accorde une réduction de 50 p. 100 sur le prix du transport) et même au delà de l'Equateur. Le lait distribué sur place est délivré au public sur ordonnance médicale, il est payé en grande partie par les Caisses d'Assurances contre les Maladies, organismes auxquels il est vendu 22 fr. 50 le litre. D'autres établissements viennent se ravitailler également en lait de femme à ce centre : hôpitaux, pouponnières, etc... Plus rarement, il est vendu à des clients isolés à un prix plus élevé lorsque ceux-ci sont aisés. Une expérience de dix-sept ans a montré les avantages de ces façons de procéder. En 1926, 1.960 litres étaient vendus ; en 1937, 6.700 litres. Depuis, d'autres offices collecteurs ont été fondés à GLEIWITZ, INTERBURG, BERLIN, BRÊME, MUNICH.

Aux Etats-Unis, un centre a été ouvert en 1910 à New-York au FOUNDLING HOSPITAL : le lait était, en 1939, vendu 120 fr. le litre, et il revenait à l'office 92 fr. A BOSTON a été créé en 1910 un centre, d'abord avec le concours de filles-mères hospitalisées, puis en 1937 avec des femmes mariées, au domicile desquelles le lait est recueilli, puis distribué après pasteurisation. Le lait mélangé est analysé une fois par semaine.

L'organisation des dépôts de lait de femme ou « Lactarium »

(1) Prix d'avant-guerre.

en République Argentine a été clairement exposée par René Paccard (156). Le Lactarium est une institution d'Etat qui, sans avoir pour but le gain, poursuit une finalité médico-sociale consistant à extraire, conserver, distribuer du lait de femme et à éviter tous les inconvénients de l'allaitement mercenaire » (Bettinotti) (14). Les donneuses sont, avant l'extraction de leur lait, soigneusement examinées, ainsi que leur enfant, surtout au point de vue vénéréologique et pulmonaire. Le lait est recueilli deux fois par jour grâce à un appareil appelé « Polyextractor B », inventé par le Docteur Saül I. Bettinotti, appareil qui permet de collecter le lait de 8 à 16 nourrices. Les laits sont mélangés, distribués, et le surplus conservé aux environs de 0°C ou à la neige carbonique.

Nous empruntons à la thèse très complète de Mme Barot-Herding (7) quelques détails sur l'organisation de centres de dépôts de lait de femme en U. R. S. S. et en Angleterre. A Moscou, un centre a été créé, où 30 à 40 nourrices, soumises au préalable à un examen médical, fournissent jusqu'à un litre de lait chacune par jour. La collecte a lieu trois fois par jour et sous la surveillance d'une infirmière. La donneuse reçoit 40 kopeks (1) les 100 grammes. Le lait est revendu à peu près au prix d'achat et donné gratuitement aux indigents ; il n'est délivré que sur ordonnance médicale.

En Angleterre, un centre dépendant des services hospitaliers devait s'ouvrir au Queen's Charlotte Hospital à Londres le 1er janvier 1939 et s'inspirer des mêmes principes directeurs que les centres américains.

En France, des organismes municipaux, tels que la Nourricerie des Enfants Assistés de la Seine, donnaient du lait de femme aux nourrissons débiles ou malades. L'allaitement était réalisé suivant les règles du Professeur Marfan (137), et paraissait diminuer considérablement la mortalité. La Nourricerie départementale du Vinatier, dans le Rhône, après avoir alimenté les enfants hospitalisés, vendait le supplément du lait au public.

C'est à la suite d'une campagne de presse du journal Le Journal que le ministre de la Santé Publique et de l'Education Physique, dans une circulaire du 12 août 1936, recommandait aux préfets la création d'une Commission chargée de l'organisation des centres de collecte de lait de femme dans les départements relevant de leur autorité.

Le 20 novembre 1936 s'ouvrait un centre dépendant de la Maternité et de la Clinique Baudelocque, sous la direction du Professeur Couvelaire. La réussite de centre incitait le Gouvernement dans une circulaire du 8 mars 1937 (108) à préciser les modalités de fonctionnement des organismes à créer en province, modalités d'ailleurs calquées sur l'organisation du centre de Baudelocque.

(1) Prix d'avant-guerre.

M. le Professeur COUVELAIRE lui-même, que nous remercions ici respectueusement de son amabilité, a bien voulu nous donner quelques renseignements sur le fonctionnement de ce centre. Le souci de donner toutes garanties aux enfants qui devaient bénéficier du lait des donneuses et de sauvegarder l'intérêt de ces dernières a conduit le Docteur COUVELAIRE à préférer le régime de l'internat à celui du ramassage à domicile ou de la vente au centre des donneuses libres à l'heure de la traite. Les nourrices sont recrutées par les soins de l'Administration de l'Assistance Publique ; elles doivent être accouchées depuis deux mois au moins ; après une surveillance médicale extrêmement stricte de deux mois, examens radiologique, sérologique, etc..., elles sont enfin admises. Elles disposent d'une chambre personnelle dans les locaux indépendants du centre proprement dit, lequel comprend en particulier une salle de traite, une salle de conservation en glacière des biberons préparés, une salle pour la distribution et la vente, communiquant avec la précédente. Les donneuses ne sortent qu'exceptionnellement et escortées d'une infirmière ; elles ne sont astreintes à aucun travail et recevaient en 1939, 680 fr. par mois. La traite se fait, sous la surveillance de l'infirmière, directement dans un biberon stérile à l'aide d'un tire-lait électrique de ABT. Le lait n'est pas stérilisé ni mélangé ; il est conservé en glacière à une température inférieure à + 4°C, et consommé dans un délai n'excédant pas 24 heures. La vente a lieu immédiatement après la traite sur présentation d'un certificat médical qui doit être renouvelé tous les quinze jours. Le prix est de 10 fr. les 100 grammes, les Assurances Sociales remboursant 60 p. 100 du prix ; quelquefois il est donné gratuitement. Beaucoup d'enfants ont pu ainsi être sauvés et les garanties assurées par ce centre et les organismes similaires sont très supérieures à celles qui sont offertes par les offices collecteurs fonctionnant à l'étranger.

DETECTION DES FRAUDES DU LAIT DE FEMME

Dans un très sommaire exposé, nous avons dessiné l'organisation des centres de dépôts de lait de femme. Nous avons signalé le contrôle plus ou moins sévère qui accompagne ou qui suit l'extraction du lait. Lorsque la nourrice donne son lait à domicile, ce qui a souvent lieu dans les offices allemands et américains, elle a toute latitude pour frauder le lait qu'elle fournit. Bien que particulièrement odieux, ce délit n'en est pas moins fréquent, et il est d'autant plus difficile à mettre en évidence que la fraudeuse bénéficie de conditions favorables à l'accomplissement de cet acte. Mme KAYSER

N. B. — Dans la revue médico-sociale de l'Enfance (46), le Professeur COUVELAIRE a exposé les détails du fonctionnement du Centre BAUDELOCQUE de Port-Royal.

a été obligée d'établir à ERFURT un système d'analyses et de contrôles extrêmement sévères. Mais il est évident qu'il est bien préférable de prévenir la fraude que d'avoir à la déceler ; c'est d'ailleurs le principe qui a inspiré le fonctionnement du centre BAUDELOCQUE. Cependant, même en France, ces falsifications, bien que difficiles, ont tout de même lieu. M. REVOL, dit M. PACCARD, a pu observer des actes délictieux : il est vrai que dans ce cas, il est facile de déceler la fraude, car la surveillance à laquelle est soumise la nourrice ne lui permet pas d'exercer son ingéniosité dans ces manœuvres criminelles, au lieu que, en Allemagne ou aux U. S. A., il est loisible aux délinquantes de substituer du lait de vache à une certaine quantité de leur propre sécrétion. M. E. KAYSER (110) indique deux sortes de falsifications : addition du lait de vache et addition d'eau. Avec PACCARD nous en ajouterons une autre : mouillage avec de l'eau sucrée. Cet auteur indique pour la détection de ces fraudes d'excellents procédés. Les méthodes appropriées doivent, d'après lui, remplir les trois conditions suivantes :

1° - Le lait devant être consommé peu de temps après l'extraction, il faut que l'analyse soit rapidement effectuée afin que l'on puisse au plus tôt apprécier sa pureté et le distribuer ;

2° - L'analyse doit pouvoir être faite dans les laboratoires les plus modestes, de manière à généraliser le contrôle du lait ;

3° - Les méthodes utilisées doivent être à la fois sûres, afin de ne pas incriminer à tort, et sensibles afin de déceler la fraude même si elle n'est que de faible importance.

Nous nous permettrons d'y joindre une quatrième condition dont l'intérêt n'échappera à personne : il faut que l'analyse soit effectuée avec des quantités de lait minimes. Un contrôle plus fréquent pourra ainsi être réalisé, car il distraira le moins possible de lait à l'enfant. Au lieu de se limiter à deux ou trois contrôles par semaine, il sera permis de multiplier ces derniers en effectuant des prélèvements quotidiennement, et même après chaque traite, soit quatre fois par jour en moyenne. « On ne saurait être ni trop attentif ni trop sévère quand il s'agit de la santé de pauvres petits êtres dont la vie est déjà si menacée ». (PACCARD). Et ceci surtout à l'époque particulièrement pénible que nous vivons, où la composition du lait peut se ressentir fâcheusement d'une alimentation défectueuse, au point que l'on a pu écrire : « De toutes les professions dangereuses, la plus incertaine est celle du nouveau-né ».

Le contrôle pourra être réalisé sur le lait non mélangé, c'est-à-dire sur la sécrétion lactée de chaque nourrice, ce qui permettra de démasquer la coupable.

D'autre part, l'enfant de la nourrice ne pâtira pas de ces fréquents prélèvements si l'importance en est minime et ne dépasse

pas deux à trois centimètres cubes. Les offices vendeurs ne subiront eux-mêmes aucun préjudice. Et grâce à des analyses aussi peu onéreuses de cette précieuse denrée, ce médicament si rare qu'est le lait humain sera en somme dans sa presque totalité consacré aux usages auxquels on le destine.

A. — Mouillage simple

Pour le lait de vache, bien des constantes ont été proposées dans le but de déceler des additions d'eau. Nous ne parlerons que des constantes chimiques qui nous intéressent plus particulièrement. Leur appréciation pourra être faite très économiquement sur de faibles quantités de lait. Par exemple, on peut citer la constante de Bouin (32) : Lactose + (Cendres x 5) ; celle de Koestler in 156) : $\frac{100 \times Cl\ \%}{\text{lactose}\ \%}$; celle de Kopatschek (116) ; lactose + (Cl. $\times 44$).

La détermination de l'extrait dégraissé (constante de L. Gras ou constante de non-beurre) fournit des renseignements intéressants. Mais à cause de ses variations en relation avec les éléments constitutifs du lait, nous serons d'accord avec Paccard (156) quand il affirme que cette seule détermination peut laisser passer la fraude inaperçue, s'il s'agit de laits à extrait dégraissé élevé, et si le mouillage est effectué à un taux relativement bas, coïncidence assez rare il est vrai, le mouillage étant généralement supérieur à 10 p. 100.

Mais la base fondamentale de la détection du mouillage a été établie par Ch. Porcher (172), qui, en 1929, écrivait : « Les composants du lait sont harmonieusement liés... Les modifications apportées dans la composition du lait par un trouble anormal... obéissent à des règles qui se traduisent par des déplacements dans l'équilibre normal, dont on peut prévoir l'orientation et l'ampleur ». En 1923, il formule les lois de l'isotonie (170) : « Le sérum lacté, surtout formé de lactose, a besoin de la présence d'une plus ou moins grande quantité de chlorures alcalins (qui, évalués en chlorure de sodium), ont un coefficient isotonique environ 12 fois plus fort que le lactose), pour que, par action compensatrice, son pouvoir osmotique atteigne celui, à peu près constant d'ailleurs, du sang de l'animal ».

Sur ce principe, Mathieu et Ferre (139) ont établi une constante permettant de caractériser le mouillage du lait : la constante moléculaire simplifiée (C. M. S.) traduit la quasi-invariabilité de la somme lactose + chlorure. Le lactose est exprimé en lactose hydraté pour 1.000 cm³ de lait, et les chlorures alcalins qui sont évalués en chlorure de sodium pour 1.000 cm³ de lait sont multi-

pliés par le coefficient 11,9. On aura donc :

$$C.\ M.\ S = L + (ClNa \times 11,9)$$

L désignant le taux de lactose.

Nous voyons que cette constante peut-être calculée sur 0.2 cm³ de lait, les chlorures étant déterminées sur 0,1 cm³, et le lactose sur la même quantité, grâce aux microméthodes que nous avons mises au point.

Nous ne parlerons pas des innombrables travaux que la C. M. S. a inspirés. Contentons-nous de dire que cette constante a été complétée en tenant compte du volume occupé par les globules de matières grasses et par les colloides protéiques du lait. On transforme en volume le poids de beurre en multipliant par 1.064, et le poids de matières albuminoïdes en multipliant par 0.74. La somme de ces produits est retranchée de 1.000, et la différence représente le volume S de sérum dans un litre de lait. On a donc la constante moléculaire simplifiée modifiée (C. M. S. m.) :

$$C.\ M.\ S.\ m. = [L + (ClNa \times 11.9)] \times 1.000/S$$

constante qui, en général, pour le lait de vache, ne doit jamais tomber au-dessous de 70. Signalons cependant que l'expert peut avoir à tenir compte d'influences parfois très particulières : à titre d'exemple, rappelons les variations de la C. M. S. sous la simple influence des facteurs climatiques (G. Mathieu) (138 bis).

Nous avons calculé la C. M. S. et la C. M. S. m. de plusieurs laits au moyen de notre système de microméthodes.

TABLEAU X. — Valeur de la C. M. S. et de la C. M. S. m. dans différents laits :

Laits numéros	C. M. S.	C. M. S. m.
40	80	82.4
41	81	85
42	75	78
43	76	80.5
44	78	80.3

Dans des laits que nous avons mouillés artificiellement, nous avons obtenus les constantes suivantes :

TABLEAU XI. — Valeur de la C. M. S. et de la C. M. S. m. sur des laits mouillés artificiellement.

Laits numéro	Laits mouillés à	C. M. S.	C. M. S. m.
45	10 p. 100	72	76
46	20 p. 100	66.9	68.2
47	30 p. 100	61.2	63

On constate que dans les cas normaux, la C. M. S. ne descend

que rarement au-dessous de 75, et la C. M. S. m. au-dessous de 80. Paccard, qui le premier a tenté une étude systématique sur les fraudes du lait de femme, a trouvé pour la C. M. S. m. qu'il appelle constante moléculaire simplifiée réelle (C. M. S. r.) un chiffre un peu inférieur au nôtre : 71. Cela tient à ce que la formule qu'il emploie :

$$\text{Lactose hydraté} + (\text{chlorures} \times 11.9) \times 1.000\,(1.000 - \frac{\text{beurre}}{0.94})$$

ne tient pas compte des matières azotées. Certes, la quantité de ces dernières est minime par rapport au lait de vache, mais il y a cependant intérêt, croyons-nous, à faire entrer ce facteur en ligne de compte. Notons que la C. M. S. r. comme la détermine Paccard ne peut donner de renseignements sur le lait anormal ayant intoxiqué un nourrisson, lait qui a été prélevé à la Nourricerie départementale du Vinatier (Professeur Rhenter) et dont il a fait l'analyse : graisses normales, chlorures élevés, lactose en faible quantité. Or, c'est justement la trop grande richesse en protides dont ne tient pas compte la formule de Paccard qui est responsable des troubles dont la C. M. S. m. permettait le signalement.

La C. M. S. permet donc la détection du mouillage, mais la C. M. S. m. est encore mieux appropriée. Ces constantes ne sont vraiment sensibles qu'à un mouillage supérieur à 10 p. 100, mais comme le souligne Paccard, il est peu vraisemblable qu'une fraude se limite à une addition d'eau inférieure à ce pourcentage, qui ne présenterait pour elle qu'un gain négligeable.

B. — Addition d'eau sucrée

1° Addition d'eau saccharosée.

Il est évident que la détermination du sucre par la méthode iodométrique ne peut conduire qu'à l'évaluation des aldoses. Il est cependant facile de rechercher et d'apprécier le saccharose éventuellement ajouté.

Contrôle qualitatif :

Nous renvoyons, pour l'étude critique ds réactions envisagées à cet effet par les différents auteurs, au travail de R. Paccard (156). Nous pensons comme lui que la réaction de Selivanoff peut fournir à ce sujet des renseignements intéressants. Elle est applicable à des quantités très faibles de lait : Voici le mode opératoire que nous conseillons :

On a préparé le réactif de Selivanoff selon la formule suivante :

Résorcine pure	4 gr.
Eau distillée	200 cm³
Acide sulfurique pur	1 cm³

0,1 cm³ de lait versé dans un petit tube à essai est additionné de 0,8 cm³ de réactif cadmique (v. p. 44) puis, après mélange, de 0,4 cm³ de soude 0.275 N ; on agite et filtre. On ajoute dans le filtrat 0,1 cm³ de réactif de SELIVANOFF, puis 0,1 cm³ d'acide chlorhydrique concentré. On mélange, on porte à l'ébullition au bain-marie pendant deux minutes. Une coloration franchement rouge sera la preuve de la présence de lévulose libéré par hydrolyse de saccharose.

On peut encore effectuer la réaction de ROMANI expérimentée déjà sur le lait de femme par R. PACCARD. C'est une modification de la réaction de MOLISH. Deux gouttes de lait sont traitées avec deux gouttes de solution alcoolique de naphtol par 3 cm³ d'acide chlorhydrique concentré. On porte à l'ébullition pendant 4 à 5 secondes. Après quelques minutes de refroidissement, on observe la coloration du mélange. Une partie de celui-ci est agitée avec 2 volumes de chloroforme, et on note également la coloration prise par le solvant. Si le lait contient du saccharose, le mélange prend une coloration violette et le chloroforme une coloration nettement rose ; alors que dans les mêmes conditions, avec du lait pur, on obtient respectivement des colorations à peine violacées ou à peine roses. On arrive ainsi à déceler une addition de 0,5 à 0,6 p. 100.

Mais il semble aussi facile d'effectuer un dosage qui nous donnera des renseignements plus précis et plus sensibles.

Contrôle quantitatif : Deux procédés de détermination peuvent être proposés :

1. On pratique un dosage iodométrique, puis après hydrolyse, une détermination par la méthode de BERTRAND qui conduit aux sucres totaux. La différence représente le saccharose ajouté. On peut effectuer une défécation cadmique sur 1 cm³ de lait au moyen de 8 cm³ de réactif cadmique et 1 cm³ de soude 1,1 N. Après filtration, on prélève 1 cm³ pour un dosage iodométrique selon la technique que nous avons indiquée plus haut. On déduira le chiffre obtenu du résultat trouvé par un dosage au moyen de la méthode de BERTRAND sur 7,5 cm³ du même filtrat que l'on aura porté à l'ébullition au bain-marie pendant 3 minutes en présence d'une goutte d'acide chlorhydrique pur.

Résultats :

Lait mouillé artificiellement avec 10 p. 100 d'eau saccharosée à 50 grammes par litre :

Dosage microiodométrique	*Dosage par la méthode de* BERTRAND
54 gr. par litre de lactose soit en glucose 108 gr. par litre	119 gr. par litre (en glucose)

La quantité de saccharose ajoutée exprimée en glucose sera donc de 119 - 108 = 11 gr. par litre, ce qui correspond en saccha-

rose à $11 \times \frac{0.97}{2}$ 5,3 l'excès de 0,3 étant imputable à la marge de différence existant entre les deux méthodes.

2. Il est plus rationnel d'employer le procédé suivant : on évalue le pouvoir réducteur par une détermination iodométrique ; puis, après hydrolyse, on effectue un nouveau dosage. La différence entre les deux résultats trouvés donnera la preuve de l'existence et la quantité de polysaccharide hydrolysable.

0,5 cm³ de lait sont déprotéinisés par 4 cm³ de réactif cadmique et 0,5 cm³ de soude 1,1 N. 1 cm³ de filtrat servira un dosage iodométrique, 1 autre cm³ sera porté à l'ébullition au bain-marie avec une goutte d'acide chlorhydrique concentré pendant 3 minutes. On neutralisera ensuite par de la soude N ajoutée goutte à goutte.

Résultats :

0,4 p. 100 de lait additionné de saccharose,

Dosage avant hydrolyse	*Dosage après hydrolyse*
100 gr. par litre	104 gr. par litre
exprimé en glucose	exprimé en glucose

Comme la méthode iodométrique n'apprécie que les aldoses, la moitié des sucres intervertis apparus après hydrolyse n'est pas estimée. Il faut donc multiplier la différence trouvée par 2, et, comme le sucre ajouté au lait est du saccharose à poids moléculaire 342, tenir compte du coefficient $\frac{0.97}{2}$

On aura donc : 104 - 100 = 4

Nous possédons ainsi un moyen rapide et précis de détermination du degré de mouillage par l'eau saccharosée.

2° *Addition d'eau sucrée par du lactose ou du glucose :*

La constante moléculaire simplifiée réelle permet la mise en évidence de cette fraude, car les chlorures ne varient pas en proportion inverse.

A. — Falsification par du lait de vache

Le temps nous a manqué pour essayer de trouver un moyen de déceler l'addition de lait de vache au lait de femme. Nous pensions en effet établir des courbes de relargage des protéines du lait de femme comme nous l'avions fait pour le lait de vache. Une modification du profil type de la courbe des lactoprotéines humaines dans le sens des courbes établies pour le lait de vache, par exemple une augmentation de la précipitation des fractions

caséiques, aurait pu permettre ainsi, nous semble-t-il, de suspecter la fraude, et même de l'apprécier quantitativement. La quantité de lait qu'auraient exigées ces recherches n'aurait pas été considérable : 10 cm³ auraient été nécessaires et auraient en même temps rendu possible la détermination des proportions respectives des différents constituants protéiques de l'échantillon envisagé. Qu'il nous soit permis de remarquer cependant que l'addition du lait de vache au lait de femme se traduit en général par une élévation sensible de l'azote protéique. Polonovski (167) fixe à 30 gr. par litre environ la teneur en protéines du lait de vache, et à 10 à 12 gr. celle du lait de femme. Notons d'ailleurs que, de toute façon, si un lait présentait un taux de protéines supérieur à 15 p. 100, il serait à rejeter.

Les proportions relatives de lactose, d'azote protéique, de chlorures, etc., dont les C. M. S. traduisent l'équilibre, renseignent d'autre part sur la valeur alimentaire de l'échantillon à examiner.

M. E. Kayser (112) a utilisé l'exposition aux rayons solaires interceptés par du verre de Hanau : le lait de femme donne une fluoréscence bleue et le lait de vache, dans les mêmes conditions, une fluoréscence jaune. Cet auteur propose aussi l'examen au photomètre de Pullfrich, et le lactotest de Koschuscharoff : 5 cm³ de lait sont dégraissés par centrifugation. Une goutte de ce produit est mélangée avec 4 fois son poids de lactotest (sérum spécial inventé par Koschuscharoff) sur une lame porte-objet de microscope. Au bout d'une demi-minute, si le liquide trouble s'éclaircit dans la partie périphérique, c'est qu'il y a du lait de vache. La coagulation apparaît alors très nettement. Au contraire, si le lait est pur, la goutte reste uniformément trouble et un nuage blanchâtre apparaît au centre : les plus petites falsifications sont ainsi décelables. Mais il est difficile de se procurer ce lactotest.

Il serait possible, mais délicat, d'après Paccard, de déceler l'addition du lait de vache au lait de femme au moyen des réactions sérologiques : les caséines de femme et de vache d'après Demanez (50) présentent des propriétés antigéniques fort différentes.

Paccard propose un test par les chlorures qui semble assez pratique ; ce test repose sur la remarque suivante : la caséine du lait de vache précipite par le chlorure de sodium à saturation, tandis que la caséine du lait de femme n'est pas floculée dans ces conditions. Donc, dans un mélange des deux laits, le précipité de caséine obtenu après saturation par le chlorure de sodium sera proportionnel à la quantité de lait de vache présenté dans le mélange, et pourra dans une certaine mesure en donner une approximation par comparaison avec une gamme-étalon. On triture 10 cm³ de lait avec 5 gr. de chlorure de sodium pur. On ajoute, au bout de quelques minutes, deux gouttes d'une solution de bleu de méthy-

lène à 1 %, pour rendre plus évident le précipité éventuel de caséine. On mélange, puis on verse le contenu du mortier dans un tube à centrifuger et l'on rince le mortier avec de l'eau saturée de chlorure de sodium. On centrifuge dix minutes à grande vitesse, puis on décante soigneusement le beurre et le liquide surnageant. On lave le précipité avec une solution saturée de chlorure de sodium. On centrifuge et on décante une deuxième fois. Dans le cas d'un lait de femme pur, on observe un simple dépôt blanchâtre formé par le chlorure de sodium ; si l'on a affaire à un mélange de deux laits, on remarque la présence d'un anneau bleu d'épaisseur variable suivant la quantité du lait de vache ajouté au lait de femme, cet anneau surmontant toujours le chlorure de sodium en excès. L'auteur a ainsi évalué le taux de lait de vache additionné au lait de femme successivement dans la proportion de 10, 20, 30, 50 %, en signalant d'ailleurs le caractère approximatif de telles déterminations.

On voit donc l'intérêt que présente dans la détection des fraudes du lait humain le système de microdosages que nous proposons. Signalons pour finir que son utilité pourra se faire sentir dans l'appréciation de la qualité d'un lait fourni par une donneuse, car les falsifications ne constituent pas la seule justification des contrôles du lait de femme.

DEUXIEME PARTIE

LES SUCRES COMBINES DU LAIT DE FEMME

I. — INTRODUCTION

On admet que des glucides sont unis à certaines protéines dont ils constituent un véritable groupement prosthétique. Les molécules auxquelles ces sucres s'unissent sont d'origine fort diverse ; fort diverse également la nature de copule glucidique.

Schützenberger réalise l'hydrolyse alcaline de l'ovalbumine à 200°C en vase clos. Il met en évidence dans les produits d'hydrolyse une substance ayant certains caractères glucidiques et qu'il appelle « amide cellulosique ». En traitant cette même protéine par hydrolyse acide, puis par digestion alcaline, Fraenkell (87) croit isoler une substance voisine de la glucosamine qu'il nomme « albamin » ; puis, avec Jellinek (88), il caractérise la glucosamine et le mannose dans le résultat de la dislocation de cette molécule protéique. Avec plus de précision, Levene (129) trouve que la fraction glucidique de l'albumine de l'œuf est constituée par quatre trisaccharides dont chacun possède deux molécules de mannose et une molécule de glucosamine. Rimington (184) arrive aux mêmes conclusions. Hewitt (100) démontre que l'ovomucoïde se caractérise par la présence d'un dioside constitué aussi par du mannose et de la glucosamine.

Dans les hydrolysats de la mucine, Landwehr (121) reconnaît l'existence de corps voisins des dextrines qu'il appelle « gomme animale », tout comme le produit qu'il isole du lait.

Existence des sucres protéidiques dans le sang

Dans le sang, certains travaux montrent comme probable l'existence d'une fraction glucidique qui se distingue du sucre protéidique par un ensemble de caractères dont le principal est une très grande labilité. Il semble par conséquent logique de considérer l existence dans certaines humeurs des organismes, d'une part du sucre protéidique proprement dit, d'autre part de glucides unis aux constituants plasmatiques d'une façon beaucoup plus lâche ; pour cette raison, ces sucres méritent d'être désignés sous le nom de « glucides faiblement combinés ». Envisageons successivement l'étude de chacune de ces fractions.

Sucre protéidique

En 1855, Figuier (75) disloque les protéines du sérum sanguin par l'acide nitrique concentré et montre que le résultat de l'opération contient une substance fermentescible. Par l'acide

chlorhydrique fort, HABERMAN et HLASIWETZ mettent en évidence des produits qui, par leurs caractères analytiques, présentent des analogies avec les glucides. ABDERHALDEN et ses collaborateurs (1) obtiennent les mêmes résultats en utilisant l'acide bromhydrique comme agent hydrolysant. H. BIERRY et A. RANC (17) traitent à l'autoclave à 120°C du plasma sanguin ; ils remarquent qu'il existe une différence sensible entre le taux de la glycémie libre et la valeur des sucres totaux après hydrolyse. Ils en concluent à l'existence d'un sucre protéidique. DUMAZERT et PENET (68) parviennent au même résultat au moyen d'une technique différente : sur le même plasma, ils dosent la glycémie libre, puis ils évaluent les glucides totaux obtenus après hydrolyse avec l'acide sulfurique fort en fonction du temps ; ils observent, après avoir déduit le taux du glucose libre, que la libération des glucides totaux est complète à partir de deux heures.

Tous ces chercheurs se sont attachés de plus à déterminer la nature du sucre protéidique sanguin. HEWITT (99), dans la sérumalbumine, met en évidence une fraction qu'il appelle séroglycoïde, en raison de sa particulière richesse en sucre, et dans laquelle il caractérise un polyholoside glucosamino-galactoso-mannosique. Ce sont les mêmes glucides qu'il isole dans la globoglycoïde provenant de la sérumglobuline, mais en proportions différentes. MARGARETT-SÖRENSEN (216) détermine dans l'albumine et dans la globuline du sérum les quantités respectives de glucosamine, de mannose et de galactose, que renferment ces protéines et précise que la glucosamine représente à elle seule plus du tiers de la fraction glucidique. Par contre, RIMINGTON (184) fait du sucre protéidique un simple glucosamino-dimannose. Partageant les vues de HEWITT et de M. SÖRENSEN, H. BIERRY (16) caractérise en 1942 dans chaque euglobuline qu'il a isolée du sérum sanguin un complexe galacto-acétylglucosamino-mannose et il apprécie la richesse en glucides de chaque fraction euglobulinique. PENET (162) montre l'existence de glucosamine dans le sucre protéidique. Il remarque de plus que ce dernier n'est pas fermentescible sous l'action de la levure de bière et estime que le taux de glucosamine est supérieur à celui correspondant à l'existence du seul galacto-glucosamino-mannose.

Le sucre protéidique apparaît donc comme une fraction stable, puisque seuls des agents d'hydrolyse puissants parviennent à rompre sa liaison avec les protéines plasmatiques. Cette stabilité lui confère un rôle biologique particulier. PENET observe une sensible augmentation des glucides fortement combinés, au cours de la glycolyse. Il rappelle d'autre part que le glucide G3 extrait du pneumocoque III, copulé à une protéine quelconque et injecté à un animal, s'est montré doué d'énergiques propriétés spécifiquement immunisantes vis-à-vis du pneumocoque III (VELLUZ) (229).

Il faut rechercher une des causes de cette spécificité dans l'inaptitude à la métabolisation du sucre protéidique, inaptitude due elle-même à la solidité de la combinaison protéo-glucidique. Bierry et Rathery (19) ont montré, au cours des variations de la glycémie provoquées par divers facteurs physiologiques ou expérimentaux, que le taux du sucre protéique présente une stabilité relativement grande. Toutes ces considérations tendraient à faire admettre que ce sucre jouerait soit un rôle de réserve, soit un rôle plastique.

Sucre faiblement combiné

Au contraire, le sucre faiblement combiné semble à priori, en raison même du caractère labile de sa molécule, plus apte à jouer un rôle métabolique important. Mais comment est-on arrivé à le mettre en évidence ? Déjà Lépine, en 1911 (125), différenciait deux sortes de sucres combinés, les uns labiles, les autres stables ; il appelait les premieres « sucre virtuel ». Fontès et Thivolle (82) désignent sous le nom de « glucide X » une substance qu'ils dosent avec leur méthode molybdomanganimétrique, d'après la différence de pouvoir réducteur obtenu entre deux dosages pratiqués sur le même plasma, l'un dans le filtrat de déprotéinisation tungstique, et l'autre après défécation mercurique. Dumazert et Penet (69), après digestion à 100°C du plasma avec de l acide acétique faible, observent la libération de glucides ; au bout de deux heures cette libération est totale. D'autre part, soumettant l'hydrolysat acétique dilué à l'action de la levure fraîche, ils constatent que la fraction glucidique libérée par acétolyse est entièrement constituée par des sucres fermentescibles. Enfin, ces sucres participent à la glycolyse sanguine, puisqu'on peut observer leur disparition complète, simultanément à celle du glucose sanguin.

De quelle nature est donc cette fraction libérable par les acides faibles ? Penet avait déjà remarqué que les variations du taux de glucides obtenus dans ces conditions sont toujours indépendantes de celles du taux du sucre protéidique ; d'autre part, alors que le sucre fortement combiné varie dans des limites assez larges pour une espèce donnée le « sucre virtuel » est sensiblement constant. En outre ce dernier passe dans les filtrats obtenus par déprotéinisation à l'acide trichloracétique ou à l'alcool-acide (Dumazert et Mlle Levy) (65) du plasma, dans lequel on peut le mettre en évidence après hydrolyse. Dans ces filtrats, concluent Dumazert et Mlle Levy, il existe donc sous la forme d'une combinaison avec un constituant plasmatique non protéique, et s'il se trouve fixé sur les protéines du sang circulant, il ne saurait l'être par des valences chimiques, comme c'est le cas pour le sucre protéidique, mais plutôt selon un mode de liaison lâche du type de celles qui existent dans les « symplexes » de Willstaetter, les

mono et polycomponants de PRZYLECKI (179), les cénapses de MACHEBŒUF, rompues à froid en milieu faiblement acide. DUMAZERT et M. LEVY ont caractérisé le glucose parmi les produits d'hydrolyse. Ils estiment que le sucre faiblement combiné est un hétéroside dont le constituant glucidique est le glucose.

LEPINE (124) avait déjà entrevu le caractère bien particulier de cette fraction glucidique en essayant de préciser son rôle biologique le désignant sous le vocable de « virtuel », il ajoutait « sucre existant en puissance, ayant le pouvoir de servir immédiatement au besoin de l'organisme ». J. ROCHE et DUMAZERT (196) le considèrent aussi comme une réserve immédiatement utilisable par *Cancer Pagurus*, au cours de l'hyperglycémie asphyxique de ce crustacé dans l'hémolymphe duquel ils ont observé sa présence. FONTES et THIVOLLE (83) trouvent que le glucide X subit in vivo des variations de même sens que celles de la glycémie libre, sous l'influence de l'adrénaline et de l'insuline. A l'encontre de ces résultats, DUMAZERT et MEMMI (67) observent que l'action de l'adrénaline et de l'insuline produisent sur le taux du sucre faiblement combiné, des variations inverses de celles de la glycémie libre. C'est donc que cette fraction labile participe à la régulation glycémique, soit comme réserve immédiatement mobilisable, soit comme intermédiaire du catabolisme du glucose. « Ces résultats joints à ceux relatifs à la participation du glucose combiné au phénomène de la glycolyse, laissent prévoir qu'il doit exister dans le sang un enzyme capable de décomposer cette molécule glucidique pour en libérer le glucose, à moins que, au contraire, sa synthèse ne soit une étape par laquelle cet ose doit passer avant de subir d'autres réactions de sa dégradation métabolique. » (DUMAZERT et MEMMI.)

II. — RECHERCHES PERSONNELLES

Nous avons estimé qu'il serait intéressant de voir si les conclusions formulées dans le chapitre précédent pouvaient être adoptées pour une autre humeur : le lait de femme. Y a-t-il un sucre combiné aux lactoprotéines humaines ? Peut-on distinguer dans celui-ci deux fractions de la même nature que celles du sang ? Autrement dit, y a-t-il dans le lait de femme un sucre fortement combiné et un sucre virtuel, comme le pensait LÉPINE, au sujet du plasma sanguin ? En ce cas, quel est le taux de ces glucides et par quelle méthode peut-on essayer de le déterminer ? Il n'est pas douteux, en effet, que la réponse à ces diverses questions présente un intérêt considérable. Au point de vue physiologique, elle permettrait d'envisager plusieurs problèmes tels que l'origine du lactose sous un jour nouveau, ou tels que la nature des rapports qui existent entre les sucres protéidiques sanguin et lacté. Dans

le domaine pathologique, elle apporterait des données supplémentaires dans l'examen de l'influence de certaines maladies, comme le diabète sur le taux des glucides lactés, par exemple. Nous envisagerons ces problèmes dans le chapitre des conclusions générales (pp. 144 et suiv.).

Certains auteurs ont étudié l'existence de sucres combinés dans le lait. Rittausen (185), en déféquant du lait dilué par de l'acétate de cuivre ou du sulfate de cuivre, constate qu'après avoir débarrassé le précipité de ses graisses par l'alcool absolu, puis par l'éther, les solutions éthéro-alcooliques obtenues laissent, après évaporation, un dépôt de « graisse » qui n'est pas entré en solution avec l'éther. Cette partie insoluble, non identifiable au sucre de lait, a été assimilée par Landwehr (153) à une « gomme animale » qui serait de nature glucidique.

Mme Husset-Bierry (104) a effectué sur le lait de femme des travaux intéressants tendant à démontrer l'existence, à côté du lactose, d'un sucre que renfermeraient le lait humain et celui de certaines autres espèces animales. La confrontation des résultats obtenus en faisant usage de divers déprotéinisants et de méthodes différentes pour l'évaluation des glucides, a permis à cet auteur de constater des divergences qui l'ont amenée à mettre en évidence la présence d'un glucide complexe dont elle a entrepris l'étude. Une défécation silico-tungstique conduit à un filtrat contenant cette substance, qui est retenue par précipitation avec du sulfate mercurique et une soution de baryte à pH 6,5. Le précipité obtenu est délayé dans de l'eau distillée et démercurisée à l'hydrogène sulfuré, puis neutralisé. D'après M. Husset-Bierry, on pourrait distinguer dans le complexe originel trois parties : une partie acido-labile qui correspond à la présence primitive d'un ester phosphorique du galactose dont la déphosphorylation au cours des manipulations d'extraction est marquée par une libération de galactose et de phosphore ; une partie alcalino-labile qui contient un corps donnant naissance à du galactose, cette substance « galactogène » appartenant probablement au groupe des hexosanes ; enfin une partie acido-stable, qui, susceptible de se scinder en galactose et en glucose, est vraisemblablement constituée par une lactosane particulière.

1. — Dosage des sucres combinés totaux du lait

Choix de la technique

Il n'est pas inutile de rappeler les diverses méthodes qui ont inspiré aux différents auteurs la détermination du sucre protéidique sanguin. Etant donné l'analogie qui existe entre les humeurs sanguine et lactée : isotonie du milieu, existence de sucre libre, ressemblances entre les sérum albumines et sérum globulines

avec les lactalbumines et lactoglobulines, il peut être profitable de nous servir des techniques proposées pour le dosage des sucres protéidiques du sang, quitte à les modifier ou même à les rejeter après avoir contrôlé leur valeur. Il convient tout d'abord de rappeler les méthodes de dosage du sucre protéidique sur les protéines isolées à l'état pur.

Nous pouvons d'abord nous adresser aux protéines isolées à l'état pur, comme le font d'une façon satisfaisante beaucoup d'auteurs, tels que Fraenkell et Jellinek (88), Hewitt (100) pour l'ovalbumine, Bierry (16) pour les euglobulines, Hewitt (99), Sorensen (216) pour l'albumine et la globuline du sérum et ces mêmes auteurs pour la caséine du lait de vache (100). Cette façon de procéder est impraticable ; elle présente l'inconvénient d'exiger des prises d'essai trop considérables ; or, nous sommes trop limités par l'exiguité irréductible de nos prélèvements, ce qui nous oblige à envisager des méthodes moins laborieuses, telles que celles qui dosent le sucre protéidique sur l'humeur totale.

Méthode de dosage du sucre protéidique sur l'humeur totale.

Rimington et d'autres auteurs, Bigwood et Vuillot (22), ont songé à mettre en œuvre la microméthode d'Hagedorn et Jensen qui présente l'avantage de réduire les prises d'essai à 0,01 et même 0,05 cm³ de plasma, mais la déprotéinisation zincique qui précède cette méthode dans son mode opératoire original est, en réalité, ainsi que nous l'avons indiqué au cours de ce travail, un moyen incomplet de déprotéinisation. En effet, Hewitt a démontré que l'appréciation du pouvoir réducteur se trouve faussé par la présence de protéines ou de leurs produits d'hydrolyse, surtout après chauffage, en présence de ferricyanure de potassium. Bierry (15) signale les fâcheuses conséquences d'une désalbumination imparfaite, et il attribue à celle-ci les résultats considérablement élevés que trouvent Moogredige et Neuberger, en comparaison de ceux qui sont présentés par Dumazert et Penet.

Nous pouvons utiliser la méthode proposée par Bierry qui passe légitimement pour une des meilleures techniques de dosage du sucre protéidique sanguin. Bierry et Magnan (18) dosent d'abord la glycémie libre sur 1 cm³ de plasma : après défécation par le nitrate mercurique et démercurisation, ils effectuent sur une partie aliquote du filtrat, un microbertrand. D'autre part, ils hydrolysent 2 cm³ du même plasma, en chauffant pendant 30 minutes à l'autoclave à 120°C avec 1 cm³ d'acide sulfurique dilué au quart. Ils défèquent ensuite l'hydrolysat au moyen de l'acide phosphotungstique et déterminent par un microbertrand le taux du sucre total. Ce dernier est trouvé plus élevé que celui de la glycémie libre. La différence entre les deux valeurs représente le sucre protéidique. Pour l'estimation de la glucosamine que renferme ce su

cre, ils conseillent de joindre au protocole expérimental, une défécation mercurique portant sur une troisième prise d'essai de plasma. Le nitrate mercurique élimine en effet la glucosamine. En déduisant le taux de sucres trouvés après déprotéinisation mercurique des résultats obtenus par le filtrat phosphotugstique, on obtient la valeur de la glucosamine.

Comprenant tout l'intérêt qu'il y a à restreindre encore les prises d'essai, Bierry (15) a indiqué une modification de cette technique permettant de doser des quantités de glucose de 0,10 mmg. à 9,2 mmg. Malgré ces grands avantages, nous avons renoncé à l'application de cette méthode. En effet, Baudoin (10) a montré que les modifications de la méthode de Bertrand ayant pour but de la porter à l'échelle microanalytique conduisaient à des résultats imparfaits, sauf cependant en ce qui concerne la technique de Fontes et Thivolle (81). Enfin, la défécation mercurique impliquait une démercurisation ultérieure, opération minutieuse et fort longue, qui compliquait singulièrement le mode opératoire.

Pour le choix du déprotéinisant, la technique proposée par Dumazert et Penet (69) nous satisfait beaucoup mieux. Voici quel en est le principe : comme Bierry, ils évaluent dans un premier dosage, la glycémie libre, mais ils emploient, sur 0,05 cm^3 de plasma, la défécation cadmique que Dumazert (63) avait d'ailleurs préconisée à cet effet. Sur le filtrat, ils utilisent la méthode d'Hagedorn et Jensen. Dans un deuxième temps, ils dosent les sucres protéidiques totaux : après hydrolyse de 0,05 cm^3 de plasma au moyen de 2 cm^3 d'une solution d'acide sulfurique normale contenant du sulfate de calmium qui servira ultérieurement à la déprotéinisation, ils portent au bain marie bouillant pendant deux heures. Le milieu est ensuite débarrassé des protéines par entraînement avec l'hydrate de cadmium formé par addition de 1 cm^3 de soude 2,275 N. Ils filtrent et procèdent à un dosage du pouvoir réducteur par la méthode d'Hagedorn-Jensen.

Ce procédé est excellent, d'abord par la qualité du mode de déprotéinisation qui est imperméable à toute substance réductrice, ainsi que nous l'avons montré (v. p. 44), par l'emploi judicieux de la microméthode d'Hagedorn-Jensen, par la petitesse des prélèvements à effectuer, enfin par la fidélité, la précision et la sensibilité qu'attestent les résultats obtenus par ces auteurs. Malheureusement, un obstacle nous interdit d'avoir recours à cette technique pour le dosage des sucres combinés du lait : l'importance de la teneur en lactose du lait ; en effet, le taux de glucose sanguin de 1 gr. par litre n'est en aucune façon une gêne ; le sucre total dosé étant environ le double de ce dernier, on peut donc légitimement estimer le sucre protéidique seul en déduisant la valeur de la glycémie libre. Mais dans le cas du lait il est indispensable de procé-

der avant toute hydrolyse à une élimination totale du lactose. Cela revient en somme à faire précéder l'hydrolyse d'une déprotéinisation cadmique et à doser directement, sur les protéines ainsi séparées, la quantité de sucres qu'elles renferment. Nous ne reviendrons pas sur les conditions que doit remplir le mode de déprotéinisation. Elles sont les mêmes que celles qui étaient requises pour le dosage du lactose, à savoir :

1° Ne pas garder de sucre libre dans le défécat protéique ;

2° Retenir toutes les substances glucidiques sauf celles qui pourraient prendre naissance au cours de l'hydrolyse ;

3° Ne pas exiger un mode opératoire trop compliqué ni trop long.

Aucun des modes de désalbumination utilisés ne répond à la fois à ces trois conditions, sauf, cependant, la défécation cadmique.

La déprotéinisation effectuée, on élimine le lactose en lavant le précipité par centrifugation à plusieurs reprises ; il ne reste plus ensuite qu'à hydrolyser les protéines, puis, après reprécipitation et filtration, à déterminer dans le filtrat le pouvoir réducteur par une méthode appropriée. En raison des excellents résultats auxquels avait conduit son application sur le sang par Dumazert et Penet, nous avons choisi la méthode d'Hagedorn-Jensen. Dans le dosage du lactose libre, elle nous a toujours donné une précision remarquable en observant certaines précautions expérimentales.

Nous avons donc retenu de la technique de Penet tout ce qui pouvait nous être utile et convenir au lait. Nous nous sommes attaché à n'en garder que les avantages. Mais bien souvent, il a été nécessaire d'y apporter d'importantes modifications.

PREMIERE TECHNIQUE

Dans un petit tube à centrifuger, muni d'une collerette, on verse 1 cm^3 de lait. Au moyen d'une burette graduée au dixième de centimètre cube, on ajoute 8 cm^3 de réactif cadmique (v. p. 44). Après agitation, on verse 1 cm^3 de soude 1,1 N. On centrifuge pendant 5 minutes. On décante en siphonant le liquide surnageant à l'aide d'une pointe de verre effilé reliée à une trompe à vide. Le culot est additionné de quelques centimètres cubes d'eau distillée, et lavé par agitation énergique au moyen d'un fin agitateur en verre, que l'on retire, cette opération terminée. On centrifuge à nouveau et l'on recommence deux fois. On verse alors 5 cm^3 d'acide sulfurique N, et l'on agite jusqu'à dissolution complète du précipité représenté par l'hydrate de cadmium et les protéines.

On bouche les tubes au moyen d'un bouchon en liège dans lequel on a pratiqué une incision longitudinale, pour laisser

échapper la vapeur d'eau au cours de l'ébullition. On porte au bain-marie bouillant.

On a effectué en même temps l'essai témoin TL, contenant la même quantité de lait que les essais véritables, mais ne subissant pas d'hydrolyse. Ce témoin est destiné à apprécier le pouvoir réducteur qui peut être apporté par les les réactifs. Les essais réels ont été effectués sur un nombre de tubes correspondant aux divers temps d'hydrolyse que l'on veut réaliser.

Dès que chaque tube a subi la durée de digestion sulfurique qui lui est assignée, on neutralise, après refroidissement, au moyen de 5 cm³ de soude N. L'hydrate de cadmium précipite et entraîne avec lui les protéines. On filtre dans un ballon de 50 cm³ ; on lave trois fois le précipité par agitation avec quelques cm³ d'eau distillée, et l'on filtre chaque fois. On porte ensuite à 50 cm³ et l'on agite. Ce volume correspond à 1 cm³ de lait. On en prélève 5 cm³ qui représentent 0,1 cm³ de lait et l'on pratique le dosage par la méthode de HAGEDORN-JENSEN.

Résultats :

Dans l'expression des résultats, où sont arbitrairement exprimés en glucose sur le tableau à double entrée (voir page 43), nous avons lu la correspondance en glucose du volume d'hyposulfite de sodium versé pour chaque tube, y compris le témoin. On a déduit le témoin du pouvoir réducteur révélé pour chaque essai. Par exemple, si nous avons versé, pour le témoin TL, 1,72 cm³, qui correspondent à 0,48 mmg. de glucose, pour un essai quelconque 0,63 cm³ qui correspondent à 2,45 mmg. de glucose, la prise d'essai contiendra 2,45 — 0,48 = 1,97 mmg.

TABLEAU XII. — *Quantités de glucides libérés (en gr. de glucose par litre) sous l'action de l'acide sulfurique N, en fonction du temps.*

Durée de l'hydrolyse (en heures et mieutes)	Pouvoir réducteur exprimé en gr. de glucose par litre	
	Premier essai	Deuxième essai
Lait 48		
0.30	1.92	1.90
1	1.85	1.83
1.30	1.12	1.90
2	0.82	0.79
2.30	0.85	0.86
3	1.80	1.78
3.30	1.05	1.03
4	1.50	1.52

TABLEAU XIII. — *Quantité de glucides libérés (en gr. de glucose par litre) sous l'action de l'acide sulfurique N, en fonction du temps.*

Durée de l'hydrolyse (en heures et minutes)	Pouvoir réducteur exprimé en gr. de glucose par litre	
	Premier essai	Deuxième essai
Lait 49		
0.30	2.10	2.12
1.15	2.23	2.20
1.45	2.15	2.11
2	2.35	2.32
2.30	2.20	2.28
3	2.23	2.21
3.30	2.30	2.32
4	2.41	2.41
4.30	2.39	2.37

Examen des résultats.

Il est bien évident que l'examen de ces résultats laisse plutôt une impression d'incohérence. A peine peut-on remarquer une tendance à la stabilisation du taux des glucoprotéides vers 3 heures, 3 heures 30. Nous avons cherché la cause de l'anarchie de ces chiffres. On ne pouvait mettre celle-ci sur le compte d'erreurs d'expérience ; en effet, comme le montrent les tableaux XII et XIII, les essais pratiqués en double étaient concordants.

Nous nous sommes demandé si, malgré tous les lavages que nous effectuions pour l'élimination du lactose, il ne restait pas, contre toute vraisemblance d'ailleurs, des traces de ce sucre. Nous avons successivement trouvé 7 gr. par litre (pouvoir réducteur exprimé en glucose) pour le premier prélèvement, 0,15 gr. pour le second, le troisième ayant donné 0,006 par litre, c'est-à-dire pratiquement rien en tenant compte des erreurs d'expérience.

Nous avons multiplié les témoins :

témoin contenant du lait et de l'acide sulfurique, ne subissant pas l'hydrolyse, et neutralisé en même temps que les essais hydrolysés.
témoin identique au précédent, mais neutralisé immédiatement.
témoin contenant du lait, mais ne renfermant pas d'acide sulfurique, et ne subissant pas d'hydrolyse.
témoin contenant du lait, subissant l'hydrolyse, mais ne renfermant pas d'acide sulfurique.

Mais tous ces contrôles ne nous ont point éclairé sur la cause des erreurs. Nous avons seulement remarqué que la valeur du témoin à neutralisation immédiate n'était pas négligeable, ce qui tendrait à prouver que les acides forts, sont capables à froid, de détacher une certaine quantité de substances réductrices.

Nous remarquions par contre que nos filtrats après la reprécipitation des protéines par la soude normale, n'étaient pas toujours parfaitement clairs. Nous avons attribué aux matières grasses englobées dans le magma protéique séparé par la première déprotéinisation, la turbidité de ces liqueurs. Nous avons essayé de les éliminer. Avant centrifugation, nous avons ajouté dans chaque tube 1 cm³ d'éther éthylique ; nous avons agité énergiquement et nous avons centrifugé. Les résultats obtenus ont été nettement meilleurs, ainsi que le montre le tableau ci-dessous.

TABLEAU XIV. — *Quantités de glucides libérés (en grammes de glucose par litre) sous l'action de l'acide sulfurique N en fonction du temps sur du lait dégraissé par l'éther éthylique.*

Durée de l'hydrolyse (en heures et minutes)	Pouvoir réducteur exprimé en grammes de glucose par litre
Lait 50	
0.30	0.61
1	0.98
1.30	1.14
2	1.50
2.30	1.52
3	2.67
3.30	2.82
4	1.74
4.30	2.01

Les résultats sont un peu meilleurs ; nous avons alors essayé une délipidation plus complète : nous avons soumis une dizaine de cm³ de lait à l'action de 10 cm³ d'éther de pétrole à 40°C, en agitant dans une ampoule à décantion, puis en soutirant le lait. Les dernières traces se solvant restant dans le lait étaient éliminées par évaporation sous pression réduite dans une cloche à vide. Nos chiffres se sont améliorés encore.

TABLEAU XV. — *Quantités de glucides libérés (en gr. de glucose par litre) par l'action de l'acide sulfurique N, en fonction du temps sur du lait dégraissé par l'éther de pétrole.*

Durée de l'hydrolyse (en heures et minutes)	Pouvoir réducteur exprimé en grammes de glucose par litre
Lait 51	
0.30	1.55
1.25	1.77
2	2.02
2.30	2.17
3.03	2.45
3.33	1.87
4.03	1.92

Les valeurs correspondant aux taux les plus élevés ne nous paraissent pas satisfaisantes.

Nous avons alors tenté de perfectionner le « dégraissage » en centrifugeant le lait pendant 15 minutes. La crème se rassemble à la surface, on la recueille avec une spatule incurvée, et l'on recommence cette opération jusqu'à ce que l'on voit disparaître à la surface les dernières traces de matière grasse. En dosant alors le pouvoir réducteur par la même méthode, nous avons obtenu les résultats suivants :

TABLEAU XVI. — *Quantités de glucides libérés (en gr. de glucose par litre) par action de l'acide sulfurique normal en fonction du temps sur du lait dégraissé par centrifugation.*

Durée de l'hydrolyse (en heures et minutes)	Pouvoir réducteur exprimé en grammes de glucose par litre	
	Premier essai	Deuxième essai
Lait 52		
0.30	1.35	1.35
1	2.10	2.15
1.30	2.90	2.88
2	3,52	3.50
2.30	4.32	4.36
3	—	—
3,30	4.02	4
4	4.31	4.35

Bien que beaucoup plus cohérents que les précédents, ces résultats ne sont pas encore très satisfaisants. Il fallait donc simplifier le mode opératoire, réduire les causes d'erreurs que pouvaient entraîner des mesures trop délicates, diminuer la disproportion qui prenait naissance entre la plus légère incorrection dans un pipettage par exemple, et l'importance des écarts qui en résultaient au dosage.

DEUXIEME TECHNIQUE

Nous avons donc modifié complètement notre technique en limitant le nombre des mesures et en rendant celles-ci plus abordables.

1. *Mode opératoire.*

a) Dégraissage : on centrifuge quelques centimètres cubes de lait pendant 15 minutes. On recueille avec une spatule incurvée comme il est dit plus haut, la crème qui se rassemble à la surface, et l'on recommence jusqu'à la disparition des dernières traces de matière grasse.

b) Déprotéinisation et élimination du sucre libre.

On intéroduit 1 cm³ de lait dégraissé dans un gros tube à centrifuger de 60 cm³. On ajoute 8 cm³ de réactif cadmique. Après agitation au moyen d'un agitateur en verre, on verse 1 cm³ de soude, 1,1 N. On agite à nouveau le milieu. Au bout de 5 minutes, on centrifuge pendant 4 ou 5 minutes. On décante la liqueur surnageante en siphonant comme il est indiqué plus haut. On lave et l'on recentrifuge trois fois.

c) Hydrolyse.

Quand le milieu est ainsi complètement débarrassé du lactose, on ajoute 5 cm³ d'acide sulfurique N. On agite jusqu'à ce que l'hydrate de cadmium et les protéines soient complètement redissoutes. L'agitateur est lavé avec un petit jet de micropissette que l'on recueille dans le tube. On bouche celui-ci avec un bouchon en liège auquel est adapté un petit réfrigérant ascendant. On porte ensuite au bain-marie bouillant. Au bout d'un temps déterminé, on retire le tube que l'on refroidit rapidement sous un courant d'eau, puis on prélève, au moyen d'une pipette de 1 cm³ graduée au vingtième de centimètre cube, 0,5 cm³ d'hydrolysat qui correspondent à 0,1 cm³ de lait, que l'on reporte dans un petit tube de 6 centimètres de longueur muni d'un bec. On neutralise avec 1 cm³ de soude 0,1 N et l'on agite. On filtre sur un filtre sans cendres de Durieux dans un petit entonnoir en verre disposé sur un tube qui servira au dosage par la méthode Hagedorn-Jensen. On lave trois fois au moyen de 1 ou 2 cm³ d'eau distillée.

On prépare un essai témoin contenant du lait et les mêmes réactifs que les autres essais mais ne subissant pas l'hydrolyse.

d) Dosage du pouvoir réducteur.

On dose par la méthode d'Hagedorn-Jensen.

Résultats :

Voici quelques-uns des résultats obtenus au moyen de cette nouvelle technique. Nous avons déduit des chiffres obtenus la valeur correspondant à l'essai témoin.

TABLEAU XVII. — *Quantités de glucides libérés (en gr. de glucose par litre) par action de l'acide sulfurique N en fonction du temps, d'après la deuxième technique.*

Lait 53

Durée de l'hydrolyse (en heures et minutes)	de glucose par litre Pouvoir réducteur exprimé en grammes
0.30	0.08
1	0.17
1.30	0.58
2	1
3.30	1.30
3	1.43
3.30	1.45
4	1.45

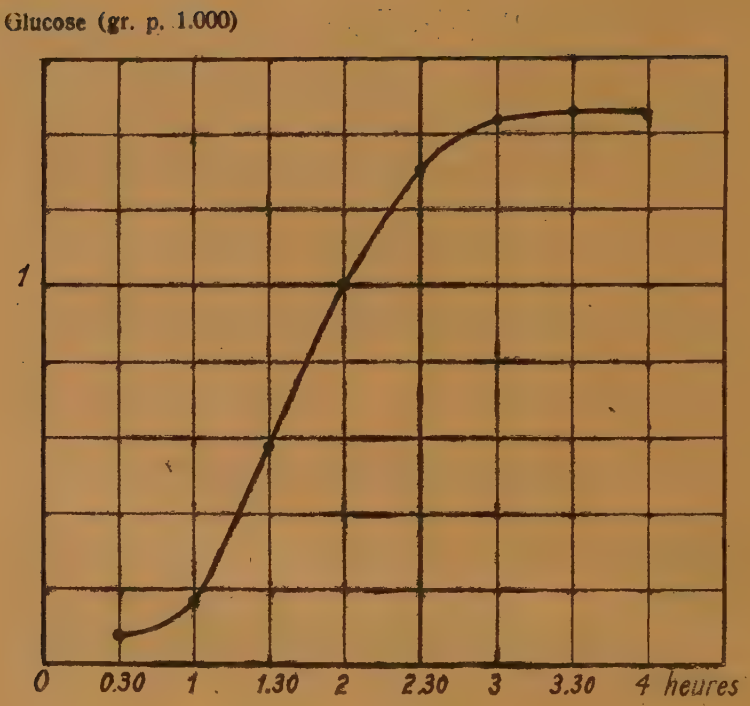


Figure 2. — Quantités de glucides libérés (en gr. de glucose par litre) par action de l'acide sulfurique N en fonction du temps, d'après la deuxième technique.

TABLEAU XVIII. — *Quantités de glucides libérés (en gr. de glucose par litre) par l'action de l'acide sulfurique N en fonction du temps, d'après la deuxième technique.*

	Durée de l'hydrolyse (en heures et minutes)	Pouvoir réducteur exprimé en grammes de glucose par litre
Lait 54	0.30	0.17
	1	0.30
	1.30	0.54
	2	0.92
	2.30	1.40
	3	1.65
	3.30	1.68
	4	1.67
	4.30	1.68

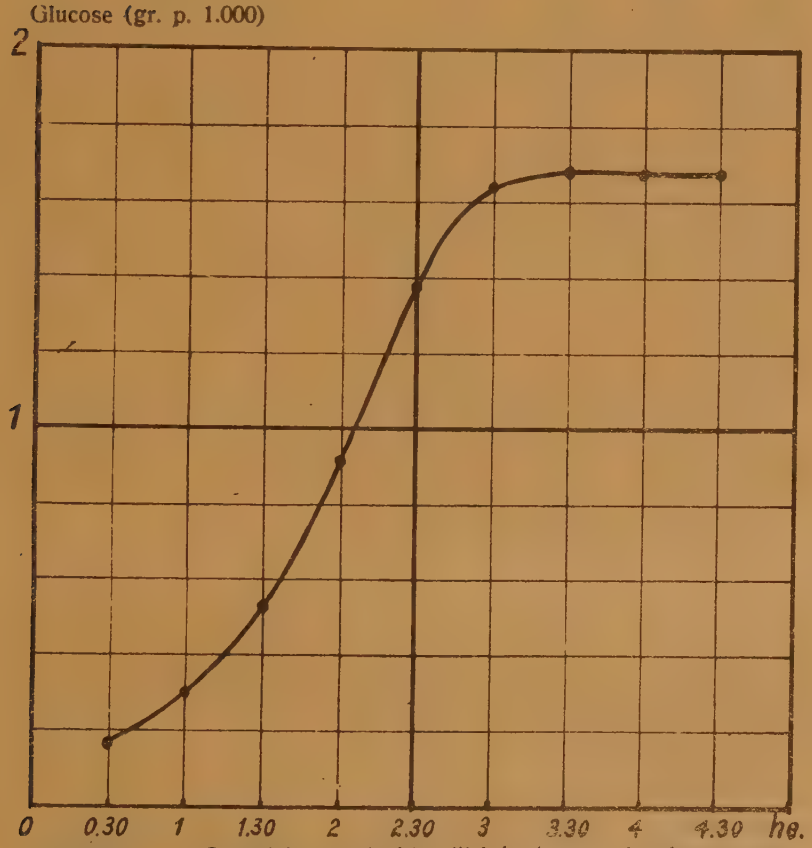


Figure 3. — Quantités de glucides libérés (en gr. de glucose par litre) par action de l'acide sulfurique N en fonction du temps, d'apres la deuxième technique.

TABLEAU XIX. — *Quantités de glucides libérés (en gr. de glucose par litre) par action de l'acide sulfurique N en fonction du temps, d'après la deuxième technique.*

	Durée de l'hydrolyse (en heures et minutes)	Pouvoir réducteur exprimé en grammes de glucose par litre
Lait 55	0.30	0.06
	1	0.18
	1.30	0.46
	2	1.28
	2.30	1.66
	3	1.80
	3.30	1.86
	4	1.87

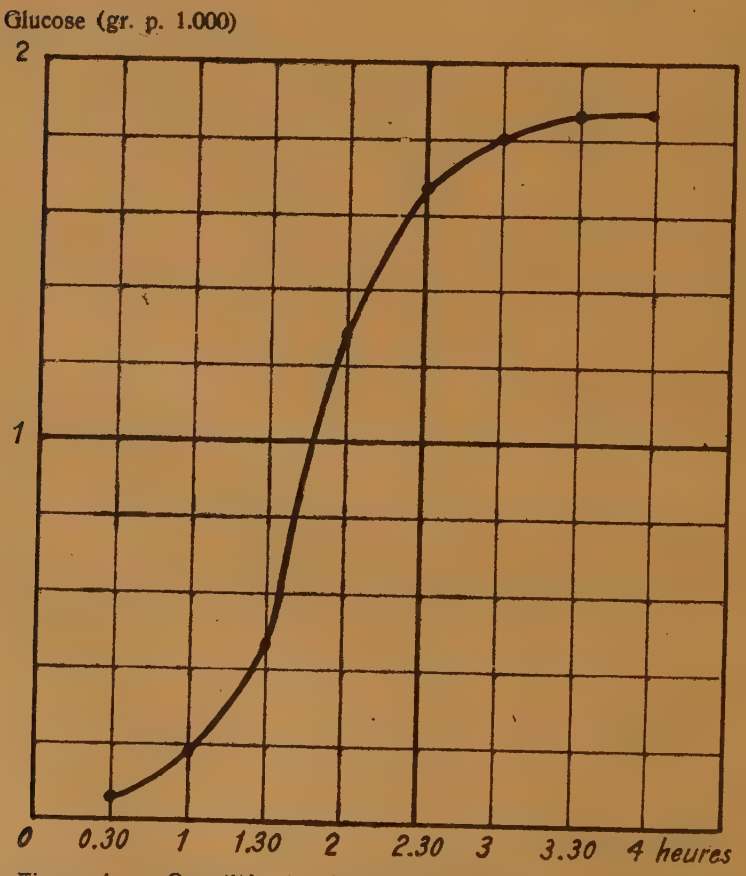


Figure 4. — Quantités de glucides libérés (en gr. de glucose par litre) par action de l'acide sulfurique N en fonction du temps, d'après la deuxième technique.

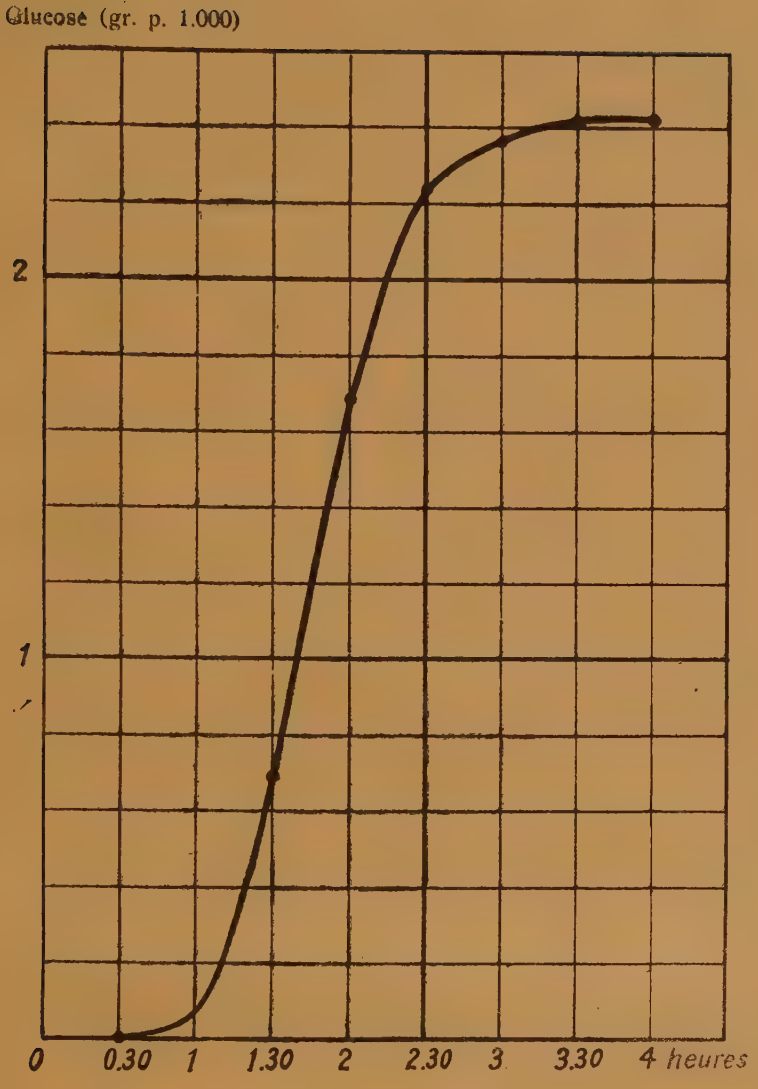


Figure 5. — Quantités de glucides libérés (en gr. de glucose par litre) par action de l'acide sulfurique N en fonction du temps, d'après la deuxième technique.

TABLEAU XX. — *Quantités de glucides libérés (en gr. de glucose par litre) par action de l'acide sulfurique N en fonction du temps, d'après la deuxième technique.*

Durée de l'hydrolyse (en heures et minutes)	Pouvoir réducteur exprimé en grammes de glucose par litre
Lait 56	
0.30	0.00
1	0.07
1.30	0.69
2	1.69
2.30	2.23
3	2.37
3.30	2.42
4	2.41

Justification de la technique.

L'examen des tableaux XVII, XVIII, XIX, XX et des courbes correspondantes (fig. 2, 3, 4, 5) permet de tirer les conclusions suivantes :

On voit que la libération du sucre protéique, d'abord faible à 0 h. 30, croît rapidement jusqu'à 2 h. 30, puis augmente plus lentement jusqu'à 3 h. 30 où il se stabilise définitivement.

Le taux de glucides mis en évidence par hydrolyse sulfurique est donc maximum à 3 h. 30. Sa valeur pour différents laits n'est pas constante : elle oscille cependant de 1,45 à 2,41, le chiffre moyen semblant se fixer aux environs de 2 gr. par litre.

Nous avons ainsi éliminé des causes d'erreurs importantes. Celles-ci étaient constituées, en majeure partie, par la présence de matières grasses — qui nous gênèrent d'ailleurs plus d'une fois au cours de ce travail. Elles étaient dues aussi à une imparfaite adaptation de la méthode aux conditions dans lesquelles nous nous trouvions. La modification de cette technique s'imposait ; elle nous conduit finalement, après bien des tâtonnements, à un mode opératoire qui s'est révélé satisfaisant. Il a, de plus, sur le premier la supériorité de simplifier considérablement les manipulations.

Ces recherches nous permettent de proposer la méthode suivante d'appréciation du taux de sucres combinés aux protéines du lait de femme :

TECHNIQUE DE DOSAGE DES SUCRES COMBINÉS TOTAUX DU LAIT DE FEMME

L'essai est effectué sur 0,1 cm^3 de lait dégraissé, que l'on verse dans un tube à centrifuger analogue à celui dont nous nous sommes servi dans la première technique de dosage. En opérant comme dans celle-ci, on ajoute 0,8 cm^3 de réactif cadmique puis 0,4 cm^3 de soude 0,275 N, quelques centimètres cubes d'eau ; on lave trois

fois par centrifugation. On hydrolyse ensuite au moyen de 0,5 cm³ d'acide sulfurique normal au bain-marie bouillant. Au bout de 3 h. 30, on retire l'essai que l'on additionne de 0,5 cm³ de soude normale ; puis on filtre sur un tube de 60 cm³ en lavant le précipité. On dose ensuite le pouvoir réducteur comme précédemment.

On a en même temps effectué un essai témoin.

Nous avons fait des dosages sur plusieurs laits et nous avons obtenu les chiffres suivants :

TABLEAU XXI. — *Valeurs des glucides libérables (en grammes de glucose par litre) par hydrolyse sulfurique, déterminées sur différents laits.*

Laits	57	1.75
	58	1.90
	59	1.82
	60	2.10
	61	2.15
	62	1.83
	63	2.01
	64	1.90
	65	2.20

Nous possédons ainsi un méthode de dosage particulièrement sensible des sucres libérables par hydrolyse sulfurique, et praticable sur de très faibles prises d'essai. Ce procédé nous a permis de constater que les protéines du lait de femme séparés par déprotéinisation cadmique, puis soumises à une hydrolyse sulfurique de 3 h. 30 libéraient après défécation du milieu et dosage dans le filtrat du pouvoir réducteur par la micro-méthode d'HAGEDORN-JENSEN, des substances réductrices de nature glucidique ; le taux de ces dernières exprimé, pour plus de commodité, en glucose, bien que variable, peut être fixé, en moyenne, à 2 gr. par litre.

Cette valeur se rapproche donc beaucoup de celle des produits oxydables que Mme HUSSET-BIERRY a assimilés à des sucres et qu'elle a fixée à 1,80 gr.

2. — Glucides faiblement combinés

Nous nous sommes ensuite posé les deux questions qu'avait soulevées PENET dans son étude sur les glucides combinés du plasma sanguin : existe-t-il uniquement du sucre protéidique, ou bien faut-il distinguer en outre une autre fraction, l'ensemble constituant les « sucres combinés » du lait ? Certains de ces glucides sont-ils fermentescibles sous l'action de la levure de bière, et quel est leur taux ?

A. — Action de l'acide acétique 0,2 normal en fonction du temps

Nous avons mis en œuvre l'action d'un agent hydrolysant plus doux que l'acide sulfurique normal. A cet effet nous avons utilisé une solution 0,2 N en acide acétique et nous avons cherché à nous rendre compte si un pareil réactif était susceptible de faire apparaître un certain pouvoir réducteur et quelles étaient les variations de celui-ci en fonction du temps.

Technique. — Dans deux gros tubes à centrifuger, on introduit 2 cm³ de lait écrémé, 16 cm³ de réactif cadmique et, après agiation, 2 cm³ de soude 1,1 N. On mélange avec soin, on centrifuge et l'on décante. On lave le précipité à trois reprises par centrifugation.

On verse ensuite 20 cm³ d'une solution d'acide acétique 0,2 N, contenant 2,2 cm³ d'acide sulfurique N. La présence de ce dernier est destinée à la redissolution de l'hydrate de cadmium. Pour obtenir 100 cm³ d'une telle solution, on mélange 20 cm³ d'acide acétique N, 11 cm³ d'acide sulfurique N, et on complète le volume à 100 cm³ avec de l'eau distillée. Après addition du réactif hydrolysant, on agite soigneusement. Un seul des deux tubes ainsi préparés est porté à l'hydrolyse, l'autre servant d'essai témoin. L'hydrolyse est effectuée suivant les mêmes dispositions expérimentales que celles qui ont été précisées pour l'hydrolyse sulfurique. Toutes les demi-heures on procède à un prélèvement de 2 cm³ qui correspond à 0,1 cm³ de lait. On neutralise la prise d'essai avec 2 cm³ d'une solution de soude 0,2 N, l'hydrate de cadmium est précipité au moyen de 0,8 cm³ de soude 0,275 N. On filtre dans un tube à centrifuger de 60 cm³ et l'on dose comme il est indiqué précédemment.

TABLEAU XXII. — *Quantités de glucides libérés (en gr. de glucose par litre) par action de l'acide acétique* 0,2 *normal en fonction du temps).*

Durée de l'hydrolyse (en heures et minutes)	Pouvoir réducteur exprimé en grammes de glucose par litre
Lait 66	
0.30	0.32
1	0.35
1.30	0.44
2	0.70
2.30	1.05
3	1.19
3.30	1.24
4	1.25

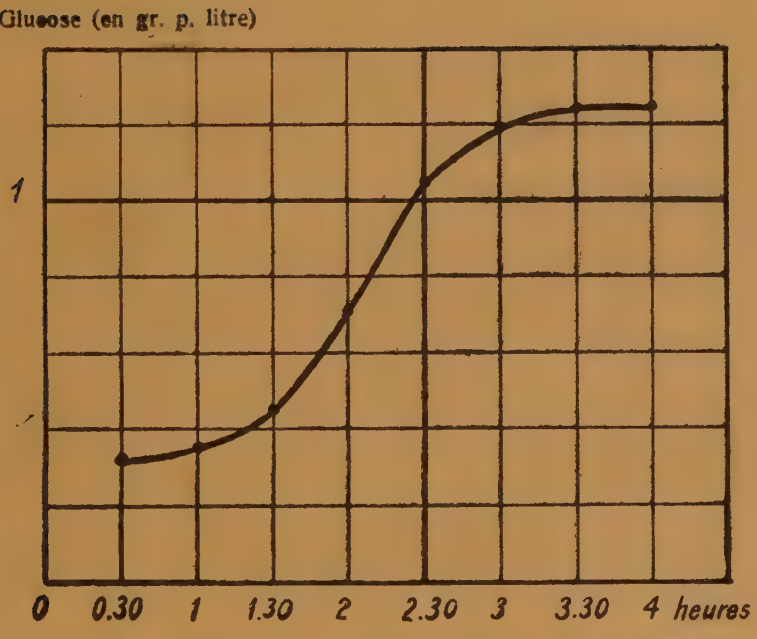


Figure 6. — Quantités de glucides libérés (en gr. de glucose par litre) par action de l'acide acétique O, 2 N, en fonction du temps.

TABLEAU XXIII. — *Quantités de glucides libérés (en gr. de glucose p. 1000) par action de l'acide acétique 0,2 N en fonction du temps.*

Durée de l'hydrolyse (en heures et minutes)	Pouvoir réducteur exprimé en grammes de glucose par litre
Lait 67	
0.30	0.53
1	0.53
1.30	0,56
2	0.64
2.30	1.10
3	1.38
3.30	1.44
4	1.44

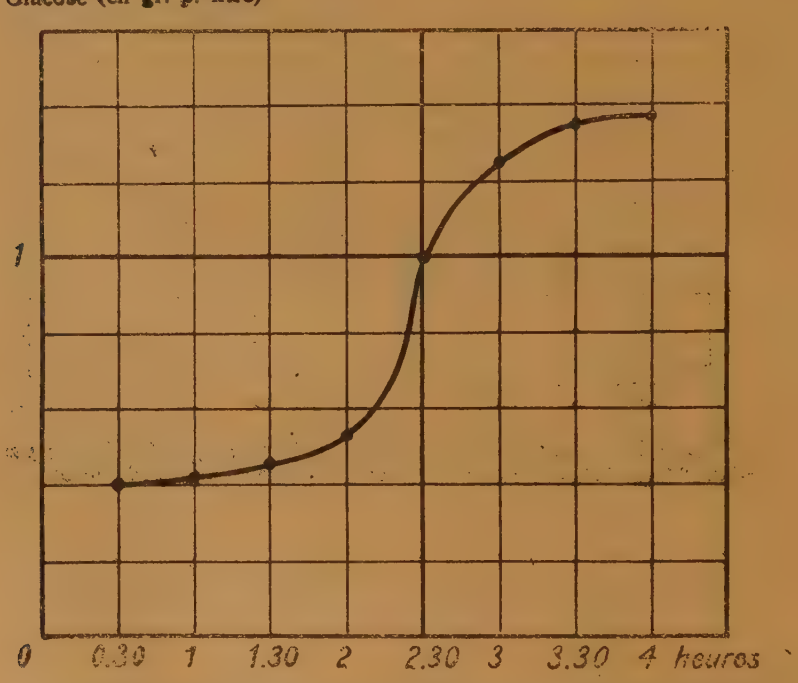


Figure 7. — Quantités de glucides libérés (en gr. de glucose par litre) par action de l'acide acétique O, 2 N, en fonction du temps.

TABLEAU XXIV. — *Quantités de glucides libérés par action de l'acide acétique 0,2 N, en fonction du temps.*

	Durée de l'hydrolyse (en heures et minutes)	Pouvoir réducteur exprimé en grammes de glucose par litre
Lait 68	0.30	0.40
	1	0.42
	1.30	0.46
	2	0.53
	2.30	0.98
	3	1.25
	3.30	1.35
	4	1.37

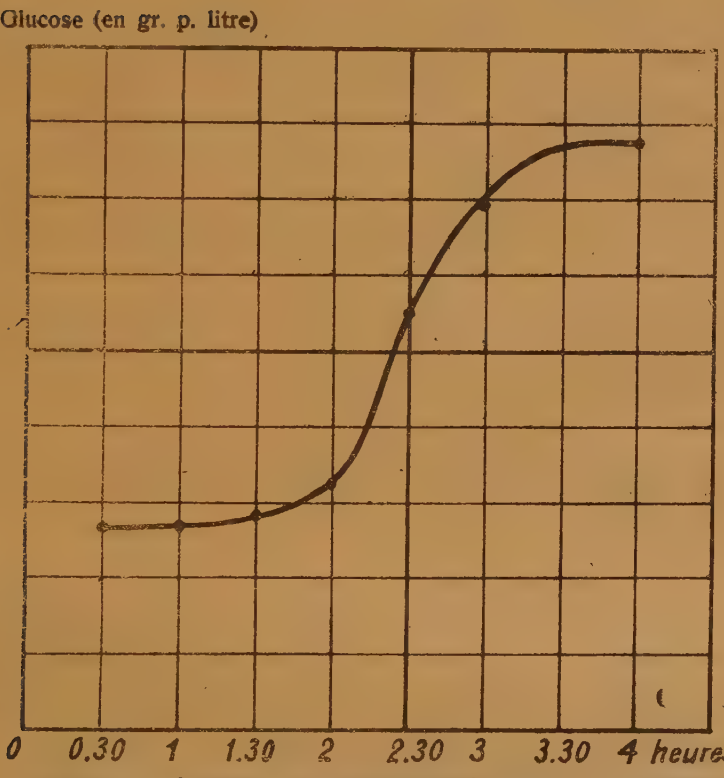


Figure 8. — Quantités de glucides libérés (en gr. de glucose par litre) par action de l'acide acétique O, 2 N, en fonction du temps.

Il ressort de l'examen des tableaux XXII, XXIII, XXIV et des courbes ci-dessus (fig. 6, 7, 8) que l'acide acétique 0,2 N libère des quantités d'oses croissantes en fonction du temps pendant les trois premières heures de l'hydrolyse. On constate ensuite que le taux des glucides dans le milieu demeure pratiquement constant.

Au bout de 3 H. 30, la production des glucides par action de l'agent hydrolysant est complète. On note que le pouvoir réducteur ainsi mis en évidence est sensiblement inférieur à celui que l'action de l'acide sulfurique normal fait apparaître dans les mêmes conditions.

B. — Comparaison entre les taux de glucides apparus respectivement après hydrolyse sulfurique et après hydrolyse acétique

Nous avons eu confirmation de ce fait en comparant sur un même lait les valeurs respectives des sucres libérables par les acides forts (acide sulfurique N) et du pouvoir réducteur apparu sous l'influence des acides faibles (acide acétique 0,2 N).

L'hydrolyse a été conduite pendant 3 h. 30, temps qui permet d'obtenir une libération complète des deux sortes de glucides. Nous avons utilisé les techniques décrites plus haut (v. p. 102) et ci-dessous.

TABLEAU XXV. — *Comparaison des valeurs obtenues respectivement par hydrolyse sulfurique et par hydrolyse acétique sur un même lait pour une durée d'hydrolyse de 3 h. 30.*

	Lait 69	Lait 70	Lait 71
Sucres libérables par hydrolyse sulfurique	2,22	1,98	2,00
Sucres libérables par hydrolyse acétique	1.44	1.01	1,10
Différence entre ces deux valeurs : (sucres fortement combinés)	0,78	0,97	0,90

On constate que les sucres libérables par hydrolyse acétique ont une valeur inférieure de moitié environ à celle des glucides apparus par hydrolyse sulfurique.

C. — Technique des sucres libérables par hydrolyse acétique

La libération maxima à 3 h. 30 par hydrolyse acétique d'une fraction des sucres combinés permet le dosage de cette dernière :

0,1 cm³ de lait est déprotéinisé par 0,8 cm³ de réactif cadmique et 0,4 cm³ de soude 0,275 N. L'élimination du lactose a lieu par centrifugation et lavage. On hydrolyse le culot de centrifugation au moyen de 1 cm³ de solution acétosulfurique (v. formule p. 104). L'hydrolysat est déféqué par 0,4 cm³ de soude 0,275 N. On dose le pouvoir réducteur par la méthode de Hagedorn-Jensen.

Nous disposons ainsi d'une méthode pratique d'appréciation des sucres libérables sous l'action de l'acide acétique, portant sur des quantités infimes de lait.

3. — Sur l'existence de deux fractions distinctes dans les glucides combinés du lait

Existe-t-il deux fractions glucidiques indépendantes l'une de l'autre dans les sucres combinés du lait ? La valeur obtenue en défalquant le pouvoir réducteur apparu sous l'action de l'acide acétique, des glucides libérables par hydrolyse sulfurique, représente-t-elle une fraction autonome, dont le taux soit indépendant de celui des sucres apparus par hydrolyse acétique et dont le mode de liaison aux constituants du lait soit de nature distincte ? Il semble qu'il en soit ainsi. En effet les variations de ces deux fractions n'ont aucune comparaison entre elles, ainsi que nous avons pu le constater au cours de différents dosages (voir tableau XXV). D'autre part, le genre de liaisons qui les rattacheraient à la molécule protéique apparaît comme étant différent pour chacune d'elles : le fait pour l'une d'être libérable par des agents hydrolysants énergiques, alors que l'autre est mise en évidence sous l'action d'acides faibles prouve que les liens qui les caractérisent ne procèdent pas de la même nature de valence.

Il est donc vraisemblable que la première fraction est assimilable aux sucres fortement combinés mis en évidence par PENET dans le plasma. La seconde, libérée par les acides faibles, est analogue au « sucre virtuel » de LEPINE et aux glucides « faiblement combinés » de PENET.

Pour préciser davantage la nature des glucides combinés du lait nous avons étudié les caractères de fermentescibilité sous l'action de la levure de bière.

4. — Etude de la fermentescibilité des sucres combinés du lait

Nous avons soumis la fraction dite faiblement combinée à l'action de la levure de bière. Pour cela nous avons effectué des dosages avant et après fermentation, la différence entre les deux déterminations représentant la quantité de sucres ayant participé au phénomène.

Pour effectuer ces recherches, il convient d'utiliser la technique suivante : 5 cm³ de lait délipidé sont additionnés de 40 cm³ de réactif cadmique et de 5 cm³ de soude 1,1 N. On élimine le lactose par centrifugation et lavage. On ajoute 50 cm³ de réactif acéto-sulfurique et l'on porte au bain-marie bouillant pendant 1 h. 30. Par ailleurs on procède à la préparation d'un témoin T qui contient la même quantité de lait et les mêmes réactifs, mais ne subissant pas l'hydrolyse. On neutralise la liqueur par 5 cm³ de soude 2 N et 5 cm³ de soude 1,1 N. On ajoute 2,5 cm³ d'eau distillée, on recueille après filtration 50 cm³ qui représentent 4 cm³

de lait. On évapore le filtrat presque jusqu'à siccité sous pression réduite. Le résidu est repris avec 8 cm³ d'eau. On amène le milieu au pH 4,5.

1° *Essai avant fermentation.*

On prélève 1 cm³ du liquide obtenu, qu'on défèque avec 8 cm³ de réactif cadmique et 1 cm³ de soude 1,1 N. On porte le volume à 10 cm³. On filtre. 2 cm³ du filtrat correspondent à 0,1 cm³ de lait qui serviront à un microdosage par la méthode de HAGEDORN-JENSEN.

2° *Essai après fermentation.*

Aux 8 cm³ qui restent de la liqueur amenée à pH 4,5, on ajoute 0,1 cm³ d'une émulsion de levure de bière dans l'eau physiologique. On dose au moyen d'un essai témoin L le pouvoir réducteur développé par la levure, en portant également à l'étuve à 37°C 0,1 cm³ de la même émulsion additionné de 4 cm³ d'eau pendant 2 h. 30. On déprotéinise au moyen de 8 cm³ de réactif cadmique et 1 cm³ de soude 1,1 N. On ajoute une quantité d'eau suffisante pour parvenir à un volume de 10 cm³. On filtre. 2 cm³ du filtrat obtenu représentent 0,1 cm³ de lait. On dose le pouvoir réducteur.

Dans l'expression des résultats ci-dessous, nous avons retranché la valeur du témoin T de celle des essais hydrolysés. Par ailleurs, nous avons déduit le chiffre correspondant au témoin L des résultats trouvés pour les essais après fermentation.

TABLEAU XXVI. — *Comparaison entre le taux de glucides libérables par hydrolyse acétique et les valeurs de glucides ayant réellement participé à la fermentation par la levure de bière, en gr. p. 1.000 cm³.*

Laits	Valeur des sucres libérables par hydrolyse acétique	Pouvir réducteur après fermentation	Glucides fermentescible
72	1,14	0,82	1,14 — 0,82 = 0.32
73	0,83	0,53	0,83 — 0,53 = 0.30
74	0,93	0,68	0,93 — 0,68 = 0.25

Le tableau montre qu'une partie des sucres libérables par hydrolyse acétique sont fermentescibles ; cette partie correspond à un tiers seulement de la valeur des glucides.

Cette étude de la fermentation tendrait à prouver la présence d'oses fermentescibles à côté d'autres sucres qui ne le sont pas, étant bien entendu que tous ces glucides pourraient provenir de l'hydrolyse d'un polyoside initial.

5. — Recherche de la glucosamine

Poursuivant nos études sur la nature des sucres combinés du lait, nous avons cherché si l'on pouvait mettre en évidence

de la glucosamine dans les hydrolysats sulfuriques ou dans les hydrolysats acétiques.

1° Dans la fraction libérable par hydrolyse acétique.

Nous avons utilisé la réaction colorée en rouge que donne la glucosamine avec la para-diméthyl-amino-benzaldéhyde après condensation à 100°C avec l'acétylacétone en milieu carbonaté (Elson et Morgan) (70). Ces recherches ont été négatives.

2° Dans la fraction libérable par hydrolyse sulfurique.

Par contre nous sommes arrivé à vérifier que cette fraction contient de la glucosamine, ce qui montre que cet amino-hexose entre dans la constitution du sucre protéique du lait.

Nous pouvons donc conclure de l'ensemble de ces résultats à l'existence d'au moins 2 fractions parmi les glucides combinés du lait de femme.

1° Une partie libérable par les acides faibles, reliée par conséquent à certains constituants du lait par des liens lâches, pour la nature desquels on pourrait invoquer les liaisons secondaires dont parle Przylecky (233). Comme Penet pour le sang, nous la qualifierons de l'épithète de « faiblement combiné ». D'autre part, cette fraction contient des oses en partie fermentescibles, dans les conditions où nous nous sommes placé.

2° Une fraction qui n'est mise en évidence que par l'action des acides forts. Pour cette raison, nous la désignerons du terme de fraction « fortement combinée ». Les sucres qui la caractérisent seraient rattachés aux protéines par des valences principales. Elle contient de la glucosamine.

Ces caractères définissent les différences qui les séparent : les sucres faiblement combinés ne contiennent pas de glucosamine. Par ailleurs, les variations de chacune de ces deux fractions sont indépendantes. Malgré ce, elles présentent chacune des valeurs moyennes de 1,10 gr. par litre pour les premières et 0,90 gr. pour les sucres fortement combinés.

TROISIEMÈ PARTIE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA CASEINE DU LAIT DE VACHE

I. — LES PROTEINES DU LAIT DE VACHE

1. — Etat de la caséine dans le lait

« Le lait peut être considéré comme un ensemble de systèmes dispersés au milieu de l'eau » (PORCHER) (172). De ces systèmes, ceux qui constituent les colloïdes protéiques sont les plus importants. En gros, on peut dire que la caséine est dans le lait en suspension colloïdale sous forme de micelles de grosseur variable. Mais, dans cet état colloïdal, elle est liée dans certains rapports au phosphore et au calcium.

Signalons d'abord que la caséine est un phosphoprotéide de pH isoélectrique 4,6 en deçà et au delà duquel elle est précipitée par les acides. Elle se comporte comme un acide qui rougit le tournesol. Ces propriétés d'anion sont explicables, PORCHER ayant montré que la caséine possède un excès de 31 carboxyles acides sur les groupements basiques NH^2. De ces fonctions acides, 19 seraient libres. Aussi existe-t-elle dans le lait sous forme de sels, le cation paraissant être le calcium dans le cas du lait de vache, et le potassium dans le cas du lait humain.

HAMMARSTEN (95), en essayant de séparer la caséine au moyen de sels neutres en excès, a prouvé que la caséine entraîne en même temps de la chaux et du phosphore dans un rapport $\frac{Ca}{P} = 1{,}9$, rapport qui est le même que celui que présente le phosphate tricalcique. Or celui-ci est insoluble, il se trouverait donc à l'état colloïdal mêlé aux micelles de caséine, avec lesquelles il est d'ailleurs produit par les cellules tapissant les acini de la glande mammaire, cellules qui, par liquéfaction de leur partie extérieure, mettent en liberté leur protoplasme plus ou moins modifié (BEAU) (12). A ce propos signalons que, d'après PORCHER, la synthèse de la caséine s'effectuerait avec les acides aminés circulant dans le sang. L'acide phosphorique proviendrait d'après MAIGS, de la dislocation des lipoïdes phosphorés (lécithines) dans l'élaboration de la matière grasse. HAMMARSTEN, VAN SLYKE et ses élèves (226) (227), PORCHER s'accordent sur ce point que la caséine est dans le lait à l'état de caséinate de calcium qui protège les phosphates de calcium et les tient en suspension dans des associations lâches beaucoup plus physiques que chimiques.

Analysant des dépôts de lait centrifugé, VAN SLYKE et BOSWORTH (226) trouvent un rapport Ca/P = 1.2. qui est celui du phosphate bicalcique.

Une autre partie du calcium et du phosphore se trouverait à l'état cristalloïdal : en filtrant en effet le lait sur une bougie de

porcelaine, procédé qui ne risque pas d'altérer la nature des protéines, on recueille, d'un côté un enduit fait de caséine et de phosphates de chaux, de l'autre un sérum contenant des cristalloïdes dont du phosphate bicalcique (PORCHER).

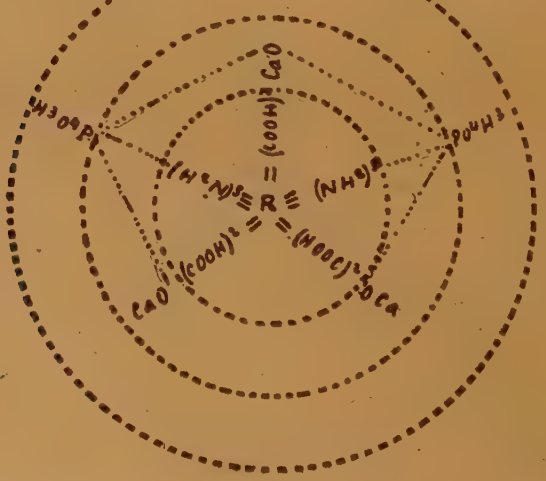
En somme, pour tous ces auteurs, la caséine participerait à une combinaison chimique : le caséinate de calcium, qui lui-même retiendrait d'une façon colloïdale des molécules de phosphate calcique.

Pour DUCLAUX (60), LINDET (133), la caséine serait en partie à l'état « muqueux », en partie en solution, en partie en suspension ; la fragilité de l'état muqueux serait responsable des effets de la coagulation, qui réaliserait ainsi une agrégation moléculaire.

Nous empruntons à M. BEAU (12) la traduction de cette théorie sous une forme moderne : « La chaux et l'acide phosphorique constituent la partie active de la micelle de caséine qui est représentée ainsi :

micelle de caséine { partie inerte ..... caséine pure } granulé positif A
micelle de caséine { partie active { ions Ca O + : ions internes
micelle de caséine { partie active { ions P2O5 — : ions externes } ions libres
liquide intermicellaire ..... ions libres.. } ions libres

Dans une étude intéressante, BEAU admet que la caséine se trouve dans le lait liée à l'acide phosphorique et à la chaux, sous une forme « électro-colloïdale », n'empêchant pas l'ensemble de présenter dans l'eau une consistance liquide homogène. Le schéma suivant rend compte de cette conception :



Le radical de la caséine est entouré par des groupes -COOH et -NH2, dans un rapport de 3 de ces derniers pour 2 des seconds, le tout formant la caséine pure inerte. Sur ce noyau « sont distribués les ions de la partie active » CaO et PO4H3, dont les premiers sont peut-être réellement combinés avec les groupes -COOH et les deuxièmes reliés d'une façon plus lâches aux groupes -NH2 en même temps. Il s'agirait en somme d'une absorption électrocolloïdale : les valences acides ou alcalines de la molécule retenant les ions externes. Cette hypothèse rendrait compte du phénomène observé par PORCHER, d'après lequel la filtration poreuse arrête un tiers de calcium et seulement un tiers de phosphore minéral. BEAU en arrive ainsi à des conclusions analogues à celles de PORCHER. Dans le lait, la caséine se trouverait sous forme d'un complexe physicochimique (caséine + acide phosphorique) ou (caséinate de calcium + phosphate de calcium), plutôt que sous forme d'une combinaison chimique véritable de phospho-caséinate de calcium.

2. — Structure de la caséine

Comportement vis-à-vis des acides et de la présure

Au point de vue chimique, on peut affirmer, après les travaux de RIMINGTON (182) (183), LEVENE et HILL (128), SCHMIDT (206), que la caséine est une protéine possédant des groupements prosthétiques de sérine-phosphate, un des groupements oxhydriles -OH de l'acide phosphorique éthérifiant la fonction alcoolique de la sérine, le second perdant une certaine réactivité chimique. C'est aussi une protéine soufrée contenant de la méthionine (3,5 %) (FOLIN et LOONEY).

La caséine ferait partie du groupe des protéines corpusculaires ou globulaires (ATABURY) (in 34). Les chaînes peptidiques sont enroulées en arrangements compacts, dont le détail n'est pas connu. Les rayons X ont montré que ces protéines sont comparables aux protéines fibreuses repliées dont le prototype est la kératine α, mais dont les chaînons seraient répartis dans les deux directions.

La caséine orienterait ses groupes pôlaires comme les autres protéines (DERVICHIAN) (57), qui nous amène à distinguer plusieurs sortes d'eaux (MEUNIER) (145) : une eau liée chimiquement par les groupes pôlaires, une eau osmotique, dans le cas où la caséine est traitée par un acide ou un alcali et dont la formation s'interprète par l'équilibre de DONNAN, une eau enfin retenue mécaniquement entre les chaînes repliées.

On conçoit qu'il suffira de peu de chose pour modifier cet édi-

fice. Cette fragilité a son importance, nous le verrons plus loin ; l'eau à 110-120°C dissout une partie de la caséine, les alcalis et les acides ouvrent les liaisons peptidiques. Et l'on peut imaginer toutes sortes d'étapes intermédiaires dans la dénaturation de l'édifice moléculaire, dénaturation que peuvent réaliser les différents agents chimiques, même quand ils sont en faible concentration.

Mlle Brigando (53) a montré les différences qui existaient entre les deux phénomènes, floculation par les acides et floculation par emprésurage, et les conséquences qui en découlaient.

Dans le premier cas, il y a modification considérable de la réaction du milieu, que la floculation ait lieu par acidification provoquée (addition d'acides) ou par acidification spontanée (acide lactique formé par les ferments lactiques aux dépens du lactose). Le calcium combiné à la caséine est libéré par double décomposition et la caséine déminéralisée insoluble précipite après que les phosphates de chaux se soient transformés en phosphates monocalciques solubles.

Le caillage du lait par la présure n'est accompagné au contraire d'aucune modification du pH : en effet la zone de coagulation optima de floculation par la présure est voisine du pH 6 (Kugelmass, 1937) (117).

Ch. Porcher, reprenant la théorie d'Hammarsten, admet que la présure aurait pour effet de détacher de la caséine, dans une réaction irréversible, une fraction, toujours la même, qui serait constituée par des protéoses.

Le ferment décomposerait en somme la caséine en paracaséine et en protéose. La précipitation n'aurait lieu que dans un deuxième temps, par la combinaison des ions calcium à la paracaséine, en paracaséinate de calcium insoluble. La présence du groupement phosphoryle s'est avérée nécessaire à la coagulation, une caséine déphosphorylée n'étant plus coagulable. La paracaséine se révèle comme essentiellement différente de la caséine. Mlle Brigando a montré ces différences d'une façon évidente (33) ; elle a préparé par ailleurs avec la paracaséine, en l'étirant dans l'eau chaude, des fils d'une finesse extraordinaire, presque invisibles. Certains liens qui retenaient les chaînes peptidiques entre elles dans la molécule de la caséine, auraient été brisées.

D'après Beau (11), la caséine légèrement polymérisée dans le lait sous la forme : $R < \begin{matrix} COO—NH \\ NH—COO \end{matrix} > R$, sous l'influence de la présure se dépolymériserait en corps moins saturé, en libérant des -COOH et des -NH2 libres suivant le schéma de Suttermeister (222) $S^s \quad (COOH)^p \quad >R< \quad P^s \quad (NH^2)^q$ S,P, étant des atomes

de soufre et de phosphore organique, ce dernier se trouvant à l'état de phosphoryle comprenant 9 OH, R étant un radical inconnu à grosse molécule, p étant égal à 114, q à 83. Les -COOH et NH_2 libres, en présence de P_2O_5 et de CaO, provoqueraient une repolymérisation en agrégats physiques stables et phospho caséinate de calcium de plus en plus volumineux, qui constitueraient ainsi le bloc de caillé.

D'après Palmer et Richardson (158), « la présure agissant sur le caséinate de calcium incomplètement formé en dispersion colloïdale, au pH du lait la transformerait en un paracaséinate de calcium encore moins complètement formé ». Ce dernier posséderait une « augmentation de capacité de liaison » et une instabilité accrue, pour les hautes températures employées dans la coagulation par la présure, instabilité qui serait responsable de la coagulation à cause de sa plus grande sensibilité, vis-à-vis des cations.

On ne peut donc recourir à la coagulation de la caséine par la présure pour étudier la constitution de cette protéine. Il en est de même pour les acides qui, bien que devant théoriquement fournir des caséines pures, donnent bien souvent dans l'industrie des produits incomplètement déminéralisés avec des teneurs en calcium résiduel variables suivant le procédé employé. D'ailleurs le produit obtenu serait-il complètement privé de calcium, que cela ne prouverait pas pour autant que la substance précipitée dans les conditions déterminées d'acidité soit assimilable au produit préexistant dans le lait (Lampitt et Bushill) (120).

3. — La caséine est-elle un constituant homogène ?

Ces préoccupations n'ont pourtant pas arrêté les chimistes, qui se sont posés la question suivante : la caséine est-elle ou n'est-elle pas un constituant homogène ?

Hammarsten (96), en 1887, affirmait que la constance des propriétés de la caséine ne laissait aucun doute sur son homogénéité. Déjà Duclaux (60) et Lindet (133) simplifiaient le problème en prétendant que c'était la même protéine qui constituait seule toute la matière azotée du lait. Ils admettaient évidemment que l'état physique, auquel correspondait pour les autres auteurs la caséine, était homogène. Plus récemment, en 1933, Demanez (50) cherche si les deux constituants mis en évidence par certains chimistes dans la caséine sont antigéniques et immunologiquement distincts; il montre qu'ils ne se comportent pas ainsi dans l'essai des précipitines. Mais il s'empresse d'ajouter que cette expérience ne saurait apporter de solution définitive à la question, l'intimité du mélange des deux protéines constitutives éventuelles de la caséine étant fort délicate à dissocier.

Malgré ces difficultés, nombreux sont les auteurs qui penchent pour l'hétérogénéité de la caséine. En 1880, Danilewski et Radenhausen (47) notent que la caséine est partiellement soluble dans l'alcool dans certaines conditions. Osborne et Wakemann (155) remarquent de même que l'alcool chaud sur la caséine dissout 0,5 % d'une protéine exempte de phosphore. Monvoisin (47), en 1920, signale que l'action de la pepsine chlorhydrique ou de la chaleur ménagée (130°C) sur la caséine conduit à l'obtention de deux matières albuminoïdes : l'une appartenant au groupe des albumines, l'autre insoluble, identifiable à un paranucléotide. Svedberg et Carpenter (223), par ultracentrifugation de la caséine « pure », trouvent un mélange de molécules de grandeurs très variables, correspondant à des poids moléculaires allant de 75.000 à 375.000 ; la caséine serait, d'après eux, une protéine polydispersée avec des micelles ayant de 20 à 140 μ de diamètre. Mais ils ajoutent que le poids moléculaire ainsi déterminé varie avec le mode de préparation de la caséine : une caséine préparée par la méthode de Van Slyke et Baker possède un poids micellaire de 75.000 ; si elle est dissoute à la température de la chambre, elle a un poids micellaire de 100.000 et de 188.000 si elle est dissoute à 40°C.

Linderström-Lang (130) (131) prétend que la caséine n'est qu'un mélange de protéines très semblables dans leur composition chimique, et qui existent soudées dans les précipités que l'on obtient avec elles sous forme de complexes de solubilités différentes. Cependant, quelques différences séparent ces fractions : composition centésimale, proportion en amino-acides dans les hydrolysats, vitesse de la cogulation par la présure, pouvoir neutralisant vis-à-vis des bases. D'après cet auteur, ces fractions ne sont pas dues à un commencement de désagrégation par l'alcool chlorhydrique utilisé pour les séparations, car l'azote formol n'est pas augmenté. En collaboration avec Sakuji Kodama (132), il fait remarquer que la solution de la caséine dans l'acide chlorhydrique dilué et le chlorure de sodium à des températures et des concentrations égales est fonction de la quantité de la caséine mise en œuvre, ce qui suppose l'existence de plusieurs fractions caséiques de solubilités différentes.

C'est à des conclusions à peu près analogues que S. P. L. Sörensen parvient en 1939 avec L. Sladek (219) (220) en considérant la solubilité de la caséine dans un excès de soude contenant un excès de chlorure de sodium S. P. L. Sörensen précise ultérieurement (218) que, dans les conditions expérimentales envisagées dans les travaux effectués avec Sladek, la tendance à la dissociation de la caséine est très considérable et que la proportionnalité approximative trouvée peut incliner à considérer la caséine comme un simple mélange et non comme une combinaison. Mais

le nombre de fractions ainsi précipitées dépasse de beaucoup celui qu'avait trouvé LINDERSTRÖM-LANG.

KONDO et YAMADA (115) constatent que la caséine du lait de chèvre dissoute dans une solution d'urée à 40 % précipite, après addition d'alcool absolu, en deux fractions présentant des différences dans leur pouvoir rotatoire, dans leur pouvoir d'absorption lumineuse, par leur teneur en tyrosine et tryptophane, en azote basique et en prosphore.

En fait, c'est en général au moyen de solutions salines que le fractionnement de la caséine a été le plus souvent opéré. ALEXANDER (3), en 1898, précipite des solutions de caséine dissoutes dans de la soude par du sulfate d'ammonium et étudie entre quelles limites a lieu la précipitation. En 1900, KOBRAK (114) remarque que la caséine du lait de vache et celle du lait de femme sont partiellement solubles dans les solutions diluées de quelques sels neutres, tels que le chlorure de sodium, le sulfate de magnésium et le sulfate de sodium ; après quelques extractions répétées, la caséine ne cède plus rien à la solution saline.

Beaucoup plus tard, en 1933, CHERBULIEZ et SCHNEIDER (42), soulignent que la constance des propriétés de la caséine ne prouve rien quant à son homogénéité : cette constance provient simplement de ce que l'on répète chaque fois les mêmes conditions de pH, de température, etc... dans sa séparation. S'appuyant sur les constatations de KOBRAK, ils étudient l'action de différents sels sur la caséine : une quantité déterminée de cette protéine est traitée par des solutions de sulfate de magnésium cristallisé avec 7 molécules d'eau, en concentration variable : ils apprécient la quantité de protéine passée en solution grâce à la précipitation d'une quantité aliquote du filtrat par l'acide phosphotungstique en solution chlorhydrique (qui ne précipite pas par le sulfate de magnésium). A 30 p. 100, et pour des concentrations plus fortes en sulfate de magnésium, il n'y a pas de précipitation par l'acide phosphotungstique ; la floculation commence pour des concentrations inférieures à 30 p. 100, et augmente à mesure que la proportion de sel décroît, jusqu'à 30 p. 100 ; la précipitation retombe ensuite à zéro en dessous de cette concentration : comparant ensuite l'action du sulfate de magnésium à celle d'autres sels, ces auteurs concluent que c'est le chlorure d'ammonium qui dissout le plus de caséine, puis le sulfate de magnésium, puis les sels de mercure, puis le chlorure de sodium et enfin le sulfate d'ammonium, qui a très peu de qualités dissolvantes. Ils étudient alors systématiquement le fractionnement de la caséine par le chlorure d'ammonium ; 5 gr. de caséine sont agités avec 500 cm^3 d'une solution de chlorure d'ammonium à 5 p. 100 ; après centrifugation, la partie soluble est décantée et additionnée de 1.800 cm^3 d'acétone ; il se produit un

précipité volumineux et incolore que CHERBULIEZ et SCHNEIDER désignent sous le nom de caséine β et qu'ils purifient par redissolution dans le chlorure d'ammonium, puis reprécipitation. Le culot de centrifugation ou caséine α est également purifié. Le rapport $\frac{\beta}{\alpha}$ est probablement — car les auteurs reconnaissent avoir eu des pertes dans la séparation de la caséine α — compris entre 1/8 et 1/5. Leur pouvoir rotatoire diffère de celui de la caséine. D'après ces auteurs, ces fractions sont parfaitement stables et la teneur en azote formol, la composition centésimale (sauf pour le phosphore et le soufre) permettent de penser qu'elles ne proviennent pas de l'hydrolyse de la caséine. Comme celle-ci, elles se solubilisent dans l'eau dès que le pH dépasse 7. Mais elles en diffèrent par les caractères suivants :

1° La caséine β a une solubilité analogue à celle de la globuline, elle est insoluble dans l'eau distillée, soluble dans les solutions salines diluées ; elle est séparable, ainsi que la caséine α, par dialyse ou salage, et précipite de sa solution saline par acidification au pH de 3,5.

2° En solution dans la soude N/100, la caséine α précipite à 22 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium et la caséine β à 30 p. 100.

3° Tandis que l'emprésurage conduit avec la caséine à un caillé ferme, l'α et la β caséine donnent avec la présure un coagulum très mou, presque fluide.

Au cours de recherches ultérieures, CHERBULIEZ et MEYER (41) recherchent si les fractions obtenues sont elles-mêmes homogènes. Ils remarquent que la caséine β qu'ils ont obtenue par le mode opératoire précédent contient encore un peu de caséine α et que celle-ci renferme elle-même plusieurs constituants. Pour la séparation de ces derniers, ils adoptent le procédé suivant : 300 cm^3 de lait écrémé sont dilués avec 600 cm^3 d'une solution contenant 45 p. 100 de chlorure d'ammonium. Ils ajoutent 229 cm^3 d'acide chlorhydrique N/10 ; la caséine α I floculе dans une proportion de 1,34 p. 100. Le filtrat additionné de 230 cm^2 d'acétone donne la caséine α II (15,9 gr. par litre). Le liquide surnageant, acidifié avec 50 cm^3 d'acide chlorhydrique N/10, laisse précipiter une troisième fraction, la caséine γ (0,12 p. 100). Les solutions résiduelles traitées par 4 volumes d'acétone, permettent l'obtention de 0,15 p. 100 de la caséine δ. Enfin, après élimination de l'acétone au bain-marie, le filtrat de cette dernière opération abandonne une substance qui est probablement de la lactalbumine dans une proportion de 0,34 p. 100.

C'est la caséine α II qui semblerait être porteur des propriétés de coagulabilité par la présure.

En 1936, Sharp et Inerney (210) traitent la caséine-présure successivement par un mélange soude + acide chlorhydrique, le chlorure de sodium et l'iodure de sodium. Les suspensions obtenues, chauffées une heure au bain-marie à la température de 40-55°C, sont filtrées et l'azote des filtrats dosé par la méthode de Kjeldhahl.

Ils répètent les mêmes opérations sur la caséine-acide et signalent que les zones de précipitation sont plus étendues pour la caséine-présure que pour cette dernière ; ils comparent l'action de différents sels de sodium. Le fluorure de sodium, le chlorure de sodium, l'iodure de sodium étendent la zone de solubilité alcaline de la caséine-acide ; le chlorure de sodium et l'iodure de sodium diminuent la zone de solubilité alcaline de la caséine-présure. Le fluorure de sodium conduit à des courbes de solubilité différentes. Enfin les auteurs observent avec le chlorure de sodium des zones de solubilité aux pH 2,5 6,0 et 9,5 et des zones d'insolubilité aux pH 1,0 4,5 7,0 9,0.

Mc Kee et Gould (143) comparent l'action sur la caséine de sels d'acides organiques : des solutions à 5 et 10 p. 100 de benzène-sulfonate de sodium et de cymène-sulfonate de sodium à un pH 4,6 sur des solutions de caséine au dixième permettent, selon eux, un fractionnement qualitatif mais non quantitatif en deux constituants au moins. Ces auteurs affirment que les risques d'hydrolyse sont nuls et ils avancent comme preuve la conservation de la coagulabilité par les acides des fractions obtenues et la constance de leur indice de réfraction. Ils concluent que la caséine serait un mélange ou un composé d'agrégats.

De tous ces travaux ressortirait l'hétérogénéité de la caséine.

Mais les procédés employés par les auteurs que nous venons de citer prêtent le flanc à de graves critiques que nous allons examiner.

D'abord, beaucoup des méthodes précitées font appel à des caséines commerciales préparées généralement par action des acides. Chaque technique de préparation conduit à une caséine différente dont le taux de déminéralisation est variable, au point que Mlle Brigando, qui a étudié avec beaucoup de détails les procédés industriels de préparation de caséine, a pu dire avec Porcher (175) qu'il y a autant de caséines que de modes de préparation. La preuve en est que chaque modification de technique conduit à une modification du schéma du produit obtenu. E.-J. Cohn et R.-E.-I. Berggreen (45) notent que si au cours de sa préparation la caséine a été amenée à une réaction alcaline franche,

le produit obtenu finalement ne ressemble pas à la caséine que l'on aurait eue autrement, ce qui prouverait qu'une légère hydrolyse s'est produite. Nous avons d'ailleurs souligné les conclusions auxquelles sont parvenus SVEDBERG et ses collaborateurs (223) au sujet du poids moléculaire de la caséine, qui est différent pour chaque échantillon de préparation différente. Or il est évident que la base essentielle de toute recherche scientifique réside dans la permanence de l'invariabilité du produit auquel elle s'adresse. Mais, même dans un procédé de préparation donné, il faut préciser les conditions de précipitation, de durée d'agitation, de vitesse d'arrivée de la soude, etc..., d'une façon très exacte et très détaillée, sous peine d'être amené à des substances différentes de celles auxquelles on parvient par le procédé choisi. Au laboratoire même, les techniques de séparation ne donnent jamais pleine satisfaction. Si l'on a recours, comme le fait HAMMARSTEN, à l'acide acétique pour la précipitation et à l'alcool-éther pour la dessication, on obtient une caséine contenant encore 0.30 à 0.40 p. 100 de cendres. Ch. PORCHER a utilisé l'acide chlorhydrique N/2, la dissolution du précipité par l'ammoniaque et le lavage et la déshydratation par l'alcool à 90°. Il est évident que l'influence de réactifs aussi violents que l'acide chlorhydrique N/2 ou l'alcool à 90° ne peut pas ne pas attenter à l'intégrité de l'édifice moléculaire. Il reconnaît d'ailleurs qu'il se forme un peu de caséinate d'éthyle et que la caséine obtenue renferme encore une certaine proportion de cendres. Cet auteur a eu ensuite recours à l'éther et à l'acétone.

En général, que l'on s'adresse à l'acide chlorhydrique, ou à d'autres agents de précipitation, on a affaire à des substances chimiques dont l'action dénaturante sur la caséine est certaine.

D'autre part les procédés utilisés pour démontrer l'hétérogénéité de la caséine sont souvent critiquables.

On imagine par exemple l'action que peuvent avoir la pepsine chlorhydrique ou la chaleur « ménagée » (à 130° C), ou l'alcool à chaud qu'emploient OSBORNE et WAKEMAN.

C'est PORCHER (172) lui-même qui a fait grief à LINDERSTRÖM-LANG de faire appel dans certains de ses travaux (1925) à de la caséine commerciale, et, dans le cas de protéine préparée au laboratoire, de n'avoir pas pris les précautions nécessaires pour assurer l'élimination de la substance azotée soluble qui se trouve associée à la caséine quand on la précipite du lait écrémé ; la caséine étant acide donne en effet, nous le disions plus haut, des éthers partiellement solubles dans l'alcool en excès.

Les conclusions de CHERBULIEZ et SCHNEIDER paraissent dans une certaine mesure sujettes à caution. L'usage de produits tels que

l'acide chlorhydrique N/10 dans l'essai de fractionnement de la caséine permet de douter de l'intégrité de cette dernière. Les constituants obtenus par les auteurs, quand ils voulurent en examiner la structure aux rayons X, présentaient un aspect brun qui pouvait laisser supposer que les fractions en question n'étaient que des produits résultant de la dénaturation de la caséine. D'ailleurs la variabilité respective des différents constituants isolés semblerait être une confirmation de cette manière de voir.

Mlle J. Brigando (34) émet elle aussi quelques doutes sur la légitimité des conclusions à l'hétérogénéité auxquelles aboutissent des méthodes qui ont recours à des réactifs chimiques susceptibles, selon elle, d'altérer la caséine : les chaînes peptidiques sont groupées pour former un certain nombre de composés ayant leur structure propre et dont les liaisons entre eux seraient fragiles ; l'action de réactifs comme l'acide chlorhydrique même dilué serait fort capable de dénouer des liens aussi lâches. Cependant elle n'exclue pas l'hypothèse d'une caséine-mélange : l'analogie avec d'autres protéines, la globuline notamment, permettant peut-être de supposer que la caséine elle aussi serait constituée de plusieurs fractions.

Cette protéine a en effet beaucoup de points communs avec la globuline ; d'après Remington (1927) (183), la globuline phosphorylée conduit à un composé qui ressemble beaucoup à la caséine.

Encore faut-il, pour pouvoir démontrer l'authenticité d'une telle conception, ne pas s'exposer à une altération de la protéine à étudier. La plupart des méthodes de recherches sur la caséine reposent sur l'hypothèse que la substance précipitée dans des conditions déterminées d'acidité est la substance préexistante. Ce n'est pas du tout certain, selon Lampitt et Bushill (120) : l'emploi d'une méthode n'exigeant pas une modification du pH doit donc donner des résultats beaucoup plus corrects. Avant tout, il faut donc ne pas toucher à l'état de la caséine tel qu'elle se présente dans le lait, et tâcher de respecter le plus possible sa structure.

En 1933, M. Beau (11) précisait déjà que les sels neutres se bornent à précipiter les agrégats moléculaires tels qu'ils sont dans le lait sous une forme pulvérulente sans aucune modification chimique. Nous verrons plus loin que l'utilisation du phénomène du relargage dans des sels neutres à pH constant peut conduire à des résultats intéressants qui permettent d'avancer quelques hypothèses sur la constitution de la caséine, et, en tout cas, de déterminer avec certitude la proportion de cette protéine contenue dans un lait donné.

Le dosage de la caséine a fait l'objet de travaux nombreux dont nous avons déjà parlé dans un chapitre précédent (voir microdosage des protéines du lait de femme). Nous citerons donc seule-

ment quelques méthodes différentes : celle de WALKER, dont la titration au formol constitue le principe, a été particulièrement étudiée par Mc-DOWALL et ses collaborateurs (141) (142) : 4 cm³ de formol sont ajoutés à 20 cm³ de lait à 70°. On utilise, comme témoin de coloration, un produit obtenu en ajoutant 3 à 4 gouttes d'acétate de rosaniline à 0,01 p. 100 au lait. Le même auteur a essayé le titrage après précipitation de la caséine par l'acide acétique et l'acétate de sodium.

En général, les méthodes classiques séparent la caséine du lait de vache par précipitation de l'acide acétique, et évaluent la proportion de cette protéine, soit par pesée, soit par la méthode de KJELDAHL. Nous avons cependant parlé de la méthode directe de dosage de DENIGES (53) des protéines totales du lait. Cet auteur apprécie de la même façon la caséine en appliquant la même méthode sur un lait privé de caséine par précipitation acétique : 50 cm³ de lait sont additionnés de 0,2 cm³ d'acide acétique cristallisable. On complète à 200 cm³. Après filtration, on termine le dosage comme pour les protéines totales. On déduit le taux de ces dernières et on a de la « caséine vraie ». PIETTRE (165) sur le lactoplasma obtenu après traitement du lait par la méthode d'ADAM, après avoir chassé l'alcool, l'éther, l'ammoniaque par chauffage au bain-marie bouillant, précipite la caséine au moyen de 1 cm³ d'acide acétique à 15 p. 100 ; on porte à l'ébullition au bain-marie pendant une demi-heure. Après filtration et dessication, on pèse. BORDAS et TOUPLAIN (30) séparent la caséine par l'alcool acétique. On centrifuge. Le culot est ensuite dégraissé par l'alcool-éther et on pèse. ROWLAND (200) se sert d'acide acétique et d'acétate de sodium : 10 cm³ de lait sont dilués avec 80 cm³ d'eau à 40°C et additionnés de 1 cm³ d'acide acétique à 10 p. 100. Dix minutes après, on ajoute 1 cm³ d'une solution N d'acétate de sodium. L'emprésurage a été aussi utilisé (PIETTRE et VILA) (166) ; mais nous avons montré l'inconvénient d'une telle façon de faire (voir p. 119).

4. — Le fractionnement des protéines du lait

Ainsi la séparation et l'étude de la constitution de la caséine ont fait l'objet de nombreuses recherches. Nous avons vu que la caséine a été tantôt considérée comme un mélange de protéines, tantôt comme une seule substance homogène. Quelques-uns en ont même fait la seule protéine existant dans le lait.

Nous avons montré que, pour DUCLAUX et LINDET la caséine représentait tout l'azote protéique du lait et qu'elle se trouvait en partie à l'état muqueux, en partie en suspension, en partie en solution. Nous avons donné le schéma susceptible d'interpréter d'une façon moderne une telle conception.

A côté de ces « unicistes », beaucoup d'auteurs décrivaient dans le lacto-sérum diverses protéines : « serai ou serac » de ZIGLER, « albumine » de BOUCHARDAT, QUEVENNE et HOPPE SEYLER, « albuminose », « galactine » de MORIN, lactoprotéine de MILLON et COMMAILLE, protéine du petit lait de HAMMARSTEN. Une telle diversité ne doit être imputée qu'à l'emploi de réactifs non spécifiques et à des précipitations incomplètes. » (M. PEYROT) (164), mais il est bien évident que les propriétés bien distinctes de l'albumine et de la globuline du lait militent en faveur de l'individualité de ces protéines.

Pour la description de ces propriétés nous renvoyons au travail de Mlle PEYROT, nous bornant à montrer les différences avec la caséine par le tableau suivant que nous empruntons à cet auteur :

TABLEAU XXVII. — *Comparaison entre les propriétés de la caséine, de la lactalbumine et de la lactoglobuline du lait de vache :*

	Caséine	Lactalbumine	Lactoglobuline
N p. 100	15.65	15.43	15.44
P p. 100	0.85	Traces	0,24
Point iso-électrique	4.6	4.4 - 4.6	5.44
Chlorure de sodium à saturation	Précipit. totale	Soluble	Soluble
Sulfate d'ammonium à saturation	Précipit. totale	Soluble	Précipitation à demi-saturation
Sulfate de magnésium à saturation	Précipit. totale	Soluble en mil. neutre	Précipitation totale

C'est sur ces propriétés différentielles que repose la plupart des procédés de séparation. SEBELIEN (209) sépare la lactoglobuline par l'action du sulfate de magnésium sur le lactosérum. Celui-ci est obtenu par précipitation de la caséine avec du chlorure de sodium. HOFMEISTER a utilisé l'ammoniaque, le sulfate de magnésium et d'ammonium en excès. La lactoglobuline est aussi isolée par SEBELIEN après élimination de la globuline du lactosérum par 0,25 p. 100 d'acide acétique. MOIR (146) détermine d'abord le taux de protéines totales par chauffage avec l'acide trichloracétique. La caséine est précipitée isoélectriquement à un pH de 4,6. Enfin le sulfate de magnésium ou le sulfate de sodium à saturation à la température de 20°C permettent la séparation de la lactalbumine.

Le chimiste russe N.P. SHMAKOVA (213), en 1939, précipitait la caséine par chauffage à 40°C du lait dilué au dixième, puis addition d'une solution d'acide acétique en présence de rouge de méthyle jusqu'à coloration rouge (pH. 4,7). Dans le filtrat porté à l'ébullition pendant 1 à 2 minutes, on précipite l'albumine qui est

lavée avec un peu d'eau tiède et qu'on minéralise par la méthode de KJELDAHL.

Mlle PEYROT (164) réalise la séparation des diverses protéines du lait de la façon suivante : elle dose d'abord l'azote total sur 0,5 cm³ de lait par minéralisation au microkjeldahl. La caséine est précipitée par 0,2 cm³ d'acide acétique sur 50 cm³ de lait. La globuline seule est évaluée par traitement du filtrat acétique avec de l'anhydride carbonique pendant une demi-heure.

Les dosages se font toujours sur les filtrats provenant de ces précipitations successives.

Soit T le taux d'azote total
n le taux de l'azote non protéique
a le taux de l'azote du petit-lait
c le taux de l'azote du petit-lait après élimination des globulines et du phosphacaséinate par S04Mg
d le taux de l'azote du petit-lait après précipitation de la globuline par CO2.

T-n = azote des matières protéiques totales du lait.
a-n = azote des matières protéiques totales du lactosérum (albumine, globuline, phosphocaséinate).
c = azote de la lactalbumine, azote non protéique.
d = azote de la lactalbumine, azote protéique, azote de phosphocaséinate.

D'où l'on tire :

Azote du phosphocaséinate : d-c = P
Azote de la lactalbumine : c-n = L
Azote de la globuline : a-n-L-P = G
Azote de la caséine (T-n)-(L-P-G) = C.

En appliquant à ces valeurs d'azote les coefficients convenables, on obtient les proportions respectives des protéines du lait.

ROWLAND (199) prétend que le fractionnement des protéines du lait est possible grâce à l'acide trichloracétique à différentes concentrations.

SCHWARZ et SCHLOEMER (208) sur le lait dilué effectuent un fractionnement à l'aide de combinaisons métalliques et d'acides : sulfate de cuivre, perchlorure de fer, oxyde de fer dialysé, sulfate d'aluminium, acide sulfurique, acide azotique. Tous ces agents ont un optimum de précipitation. Pour le sulfate de cuivre, la quantité d'albumine précipitée augmente avec l'addition de ce sel ; avec un grand excès il n'y a pas dissolution, mais simplement une fine dispersion du précipité.

Mais les protéines du lactosérum sont-elles elles-mêmes des constituants homogènes ? M. SÖRENSEN et A.-H. PALMER (217) ont

étudié, en 1938, la légère tendance à la dissociation que présentait la lactoglobuline cristallisée dans des solutions très diluées de chlorure d'ammonium à un pH constant (5,21). Les résultats obtenus sont en accord, d'après ces auteurs, avec ceux qui ont été trouvés dans les laboratoires de Svedberg par Kai O. Pedersen (160) au moyen des méthodes d'ultracentrifugation.

Il ressort de tous ces travaux que les sels neutres ont eu la faveur de beaucoup de chimistes dans la séparation des lactoprotéines. D'autres auteurs ont utilisé les acides, certains les acides et les sels neutres, quelques-uns se sont adressés, quant à l'homogénéité des différentes protéines du lait, à cette humeur directement ; la plupart sont partis de protéines préalablement isolées. Cependant, à notre connaissance, l'application de la technique des courbes de solubilité par relargage direct des protéines du lait en présence de sel neutre, n'a pas été envisagée.

II. — RECHERCHES PERSONNELLES

Les méthodes des courbes de solubilité

Nous renvoyons, pour l'historique de cette question, au travail de Mlle M. Moutte (150) sur la solubilité en présence de sels neutres et la spécificité des hémoglobines sanguines.

C'est un fait connu depuis longtemps que la solubilité des protéines diminue à mesure qu'on enrichit le milieu en sels neutres. Ce phénomène de relargage a été interprété par E.J. Cohn (44), qui, étudiant la solubilité des protéines en solution saline concentrée, établit que l'influence précipitante des sels neutres sur les protéines est un phénomène dû aux actions entre les ions du sel et les particules protéiques et élabore d'après la théorie de Debye et Huckel la relation suivante :

$$\log S = \beta' - K's \frac{\Gamma}{2}$$

dans laquelle S représente la solubilité du protéide en grammes d'azote protéique par litre, $\frac{\Gamma}{2}$ la force ionique de la solution saline rapportée à 1.000 cm³ de celle-ci. Le terme K's définit le coefficient angulaire de la droite exprimant graphiquement les variations du logarithme de la solubilité de la protéine en fonction des variations de la force ionique $\frac{\Gamma}{2}$; sa valeur dépend de la

protéine et de la nature du sel précipitant, et est indépendante de la température et du pH ; elle est donc caractéristique de la protéine en présence d'un sel neutre déterminé. β' est une constante correspondant à $\log S$ pour $\frac{\Gamma}{2} = 0$. Ce coefficient, déterminé par extrapolation à partir de la droite exprimant les variations de $\log S$, traduit théoriquement la solubilité du corps étudié en milieu aqueux pur ; sa valeur varie suivant les conditions de pH et de température.

L'existence d'une relation linéaire entre $\log S$ et $\frac{\Gamma}{2}$, démontre que les variations de S en fonction de celles de $\frac{\Gamma}{2}$ doivent se traduire graphiquement par une courbe exponentielle.

En fait, les variations de la solubilité d'une protéine pure dans des milieux de force ionique croissante s'inscrivent tout d'abord sur un graphique dans lequel S est porté en ordonnées et $\frac{\Gamma}{2}$ en abcisses selon une horizontale correspondant à un palier de solubilité totale. La précipitation commence à partir d'une certaine valeur de $\frac{\Gamma}{2}$, et dès lors se poursuit progressivement, S tendant asymptotiquement vers l'ordonnée O. Les variations de $\log S$ en fonction de $\frac{\Gamma}{2}$ sont rigoureusement linéaires et la détermination de la valeur des « constantes de solubilité » (salting-out constants) permet de caractériser d'une façon satisfaisante une protéine.

Une telle confirmation expérimentale a été apportée par les travaux de Macheboeuf et Sörensen (135) sur l'ovalbumine, de Green, Cohn et Blanchard (92) sur l'hémoglobine humaine et celle de cheval, de Florkin (79) sur le fibrinogène, de Roche, Derrien et Moutte (191) et de Roche, Derrien et Vieil (195) sur les hémoglobines et les myoglobines (hémoglobines mulculaires) de diverses origines animales, et enfin de Roche, Derrien et Mandel (192) (193) sur les cristalbumines et les glycoprotéines du sérum de cheval.

Dans le cas d'un mélange de protéines de solubilité différente, par exemple pour les milieux protéiques naturels, la précipitation

de celles-là ne s'effectue pas simultanément. Bien au contraire, ce phénomène s'inscrit graphiquement selon une succession de segments d'exponentielles séparés par des points anguleux. L'étude des caractères de solubilité d'une protéine pure, de même que celle du mélange artificiel de tels corps (Roche, Derrien, Autran) (189), permet d'admettre en première approximation que les segments de courbes précités traduisent respectivement la précipitation des diverses fractions protéiques du milieu, chaque point anguleux correspondant au début de précipitation de l'une d'entre elles.

Cette méthode d'analyse a surtout été appliquée aux protéines sériques ou plasmatiques.

Les recherches poursuivies dans cette voie de 1922 à 1939 par Howe (101), Ruszcynsky (201), Butler et Montgomery (39), Butler, Blatt et Southgate (38), A. Roche, Dorier et Samuel (188), J. Roche, Derrien et Chouaïech (190) ont démontré qu'il en est bien ainsi, mais n'ont réussi à individualiser qu'un petit nombre de constituants protéiques dans le sérum, soit 2 à 3 globulines et 1 à 2 albumines. Des perfectionnements techniques et une amélioration notable de la précision expérimentale ont permis à Y. Derrien (56) d'identifier avec certitude la présence, dans cette humeur, d'au moins douze constituants protéiques de solubilité différentes, dont sept appartiennent au groupe des globulines et cinq à celui des albumines.

Nous voyons donc quels services a rendu la méthode des courbes de relargage par les solutions salines pour objectiver l'hétérogénéité d'un milieu protéique et préciser le nombre maximum de ses constituants. Elle permet de plus de déterminer les marges de concentration en sels auxquelles chacun de ces éléments précipite seul, et d'aborder ainsi le fractionnement de tels mélanges en leurs constituants (Roche, Derrien et Mandel) (194).

La méthode des courbes de relargage sur le lait des vaches

Ce sont ces considérations qui ont guidé les efforts que nous avons tentés sur les protéines du lait de vache.

Linderström-Lang et ses collaborateurs, S.P.L. Sörensen s'étaient déjà inspirés de données analogues à celles de Cohn, mais nous avons exposé les critiques auxquelles pouvaient prêter les études effectuées par ces auteurs sur la solubilité de la caséine au moyen des acides faibles. Il faut noter cependant les recherches de M. Sörensen sur la tendance à la dissociation de la lactalbumine cristallisée, travaux dans lesquels l'auteur avait recours à des solutions diluées de chlorure d'ammonium, et que nous avons déjà cités.

Mais nous pensons qu'il y aurait intérêt à s'adresser pour ce

genre d'étude à l'humeur elle-même, et non à des protéines cristallisées, autrement dit, à chercher les résultats auxquels peut conduire la précipitation fractionnée des protéines constitutives du lait, telles qu'elles se trouvent dans cette sécrétion, au lieu de faire porter les recherches sur les protéines isolées et vraisemblablement modifiées. Nous pensons ainsi obtenir des renseignements directs et peut-être plus authentiques sur la constitution des lactoprotéines et sur leur hétérogénéité éventuelle.

Nous avons établi des courbes de solubilité du lait de vache préalablement dégraissé en présence de quantités croissantes d'un mélange tampon de phosphates de potassium. Dans les filtrats correspondants à des pourcentages différents en sels, nous avons évalué l'azote protéique par minéralisation d'une quantité aliquote de ces filtrats, et dosé par la méthode microkjeldahl. Les valeurs trouvées traduisent la solubilité des protéines aux diverses concentrations utilisées.

Dans le choix du sel neutre nous nous sommes arrêté à un mélange tampon équimoléculaire de phosphates mono et dipotassique 3,5 M correspondant à un pH de 6,5 (solution d'E.-J. Cohn). Nous avons montré en effet la nécessité de conserver au milieu une réaction ionique invariable. Nous avons renoncé pour cette raison à l'usage du sulfate d'ammonium, qui présente en outre l'inconvénient de compliquer singulièrement le protocole expérimental.

Technique utilisée. — Le premier temps consiste en l'écrémage du lait. Nous avons réalisé ce dernier par une centrifugation de 25.000 tours à la minute à l'appareil de Sharpless sur une centaine de centimètres cubes.

Nous avons préparé dans de petits ballons à fond plat d'une capacité de 50 cm^3 une série d'essais de concentration croissante en phosphates, contenant chacun 4 cm^3 de lait écrémé et 16 cm^3 d'un mélange d'eau distillée et de solution saline, tel que le pourcentage de cette dernière d'un tube à l'autre augmente de 2,5, et que la concentration de tels échantillons soit comprise entre 10 et 80 p. 100 en volume de la solution saline mère. Nous avons réalisé ainsi chaque fois une dilution au cinquième du lait.

Au moyen de burettes graduées au 1/20 de cm^3, nous avons d'abord versé la solution de phosphates, puis l'eau distillée, enfin, après agitation, le lait.

Après homogénéisation par agitation, on place les ballons dans un thermostat réglé à une température voisine de 22°C. L'équilibre entre la phase dispersée et la phase précipitée est largement atteint en 18 heures.

Dans une série de tubes correspondant à chaque ballon, on filtre le contenu de ces derniers. Sur les liquides ainsi obtenus, on effectue des prélèvements tels que le taux d'azote qu'on leur attribue soit compris entre 0,5 de 2 mmg.

Ces prises d'essai sont introduites dans des matras Kjeldahl de 50 cm³, numérotés, pourvus d'un col particulièrement long. Dans chacun d'eux, on met une pincée de catalyseur de DUMAZERT et MARCELET (66), composé de sélénite de mercure et de sulfate acide de potassium. On verse ensuite 3 cm³ d'acide sulfurique pur.

On a procédé d'une part à la réalisation d'un témoin contenant les mêmes réactifs et où l'on a remplacé le lait par 4 cm³ d'eau distillée, d'autre part à la préparation d'un essai contenant 0,2 cm³ de lait afin d'évaluer la teneur en azote total, et d'un autre essai ayant pour but la détermination de l'azote non protéique, en prélevant 0,5 cm³ du filtrat provenant de la défécation à volume égal du lait par de l'acide trichloracétique à 20 p. 100.

On minéralise sur une rampe à gaz, d'abord à feu doux, pour que la mousse provoquée par la présence de graisses résiduelles n'entraîne pas des pertes par débordements. La délipidation à la SHARPLESS a donc pour but de diminuer le plus possible ces risques. Le choix de matras à col long répond aussi à cette préoccupation. Comme nous l'avons indiqué dans le chapitre des microdosages des protéines du lait de femme, il est inutile de faire usage des petits entonnoirs en verre destinés en principe à faciliter la condensation des vapeurs sulfuriques ; cette précaution a simplement pour effet d'introduire des facteurs d'erreur, si cette verrerie n'est pas méticuleusement propre. La condensation des vapeurs s'effectue d'ailleurs parfaitement sur les parois du col. Pour régulariser l'ébullition, nous avons d'autre part introduit 2 ou 3 petites billes en verre dans chaque ballon. Quand la mousse a cessé de se former, on augmente la pression du gaz, et l'on minéralise à flamme chauffante. Le liquide noir d'abord s'éclaircit peu à peu. Quand il est complètement limpide et incolore, soit après une ébullition d'une heure à deux heures suivant la teneur en azote, on retire les ballons « cuits » et on les laisse refroidir.

On distille au microkjeldahl l'ammoniaque formé par déplacement au moyen de 15 cm³ de lessive de soude à 40 p. 100. On recueille le distillat dans 10 cm³ d'une solution N/70 d'acide sulfurique. L'excès d'acide non combiné en sulfate d'ammonium est dosé à l'aide d'une solution de soude N/70 dont on a vérifié préalablement la correspondance avec l'acide, et qu'on verse dans une burette graduée au vingtième, munie d'une pointe Nicloux permettant d'apprécier le 1/100ᵉ de cm³. Nous avons adopté la technique de dosage alcalimétrique de M. NICLOUX (154) dont le point essentiel réside dans l'ébullition de l'essai avant le titrage et au

TABLEAU XXVII. — *Relargage des protéines d'un lait de vache par un mélange équimoléculaire de phosphates mono et dipotassique à concentration croissante, à pH 6,5 et à la température de 22°C.*

N°s des tubes	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	21
Concentration en sel (p. 100 de la solution saline)	30	32,5	35	37,5	40	42,5	45	47,5	50	52,5	55	57,5	60	62,5	65	67,5	70	0
Force ionique	2,100	2,275	2,450	2,625	2,800	2,975	3,150	3,325	3,500	3,675	3,850	4,025	4,200	4,375	4,550	4,725	4,900	
cm³ de solution saline	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5	10	10,5	11	11,5	12	12,5	13	13,5	14	0
cm³ d'eau distillée	10	9,5	9	8,5	8	7,5	7	6,5	6	5,5	5	4,5	4	3,5	3	2,5	2	16
cm³ de lait	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
prise d'essai en cm³	1	1	1	1	1	2	9	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	1
mg. d'N par cm³ de lait au 1/5 (ou gr. d'N par litre de lait au 1/5)	0,945	0,932	0,824	0,553	0,524	0,255	0,240	0,231	0,207	0,208	0,198	0,192	0,190	0,183	—	0,163	0,158	0,948

N total non protéique : 0,046

TABLEAU XXVIII. — *Relargage des protéines d'un lait de vache par un mélange équimoléculaire de phosphates mono et dipotassique à concentration croissante, à pH 6,5 et à la température de 22°C.*

Nos des tubes	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24 (N Total)
Concent. en sel (p. 100 de la sol saline)	30	32,5	35	37,5	40	42,5	45	47,5	50	52,5	55	57,5	60	62,5	65	67,5	70	72,5	75	77,5	80	0
Force ionique $\leq/2$	2,100	2,275	2,450	2,625	2,800	2,975	3,150	3,325	3,500	3,675	3,850	4,025	4,200	4,375	4,550	4,725	4,900	5,075	5,250	5,425	5,600	
cm^3 de sol. sal.	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5	10	10,5	11	11,5	12	12,5	13	13,5	14	14,5	15	15,5	16	0
cm^3 d'eau distillée	10	9,5	9	8,5	8	7,5	7	6,5	6	5,5	5	4,5	4	3,5	3	2,5	2	1,5	1	0,5	0	16
cm^3 de lait	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
prise d'essai en cm^3	1	1	1	1	1	2	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	1
mg d'N par cm^3 de lait au 1/5 (ou gr. d'N par l. de lait au 1/5)	0,960	0,926	0,750	0,648	0,624	0,290	0,263	0,217	0,217	0,212	0,205	0,207	0,202	0,199	0,196	0,195	0,186	0,177	0,157	0,150	0,145	0,950

N total non protéique : 0,050

FIG. 9. — Variations de la solubilité S des protéines totales d'un lait de vache dilué au 1/5, en fonction de la concentration du milieu en mélange équimoléculaire de phosphates mono et dipotassique, à concentration croissante, à PH 6,5 et à 22°C.

Abcisses : C = p. 100 en vol. de PO4 KH2 + PO4 K2 H, 3,5 M.

Ordonnées : S = Mg de N p. 100 cm3 de filtrat.

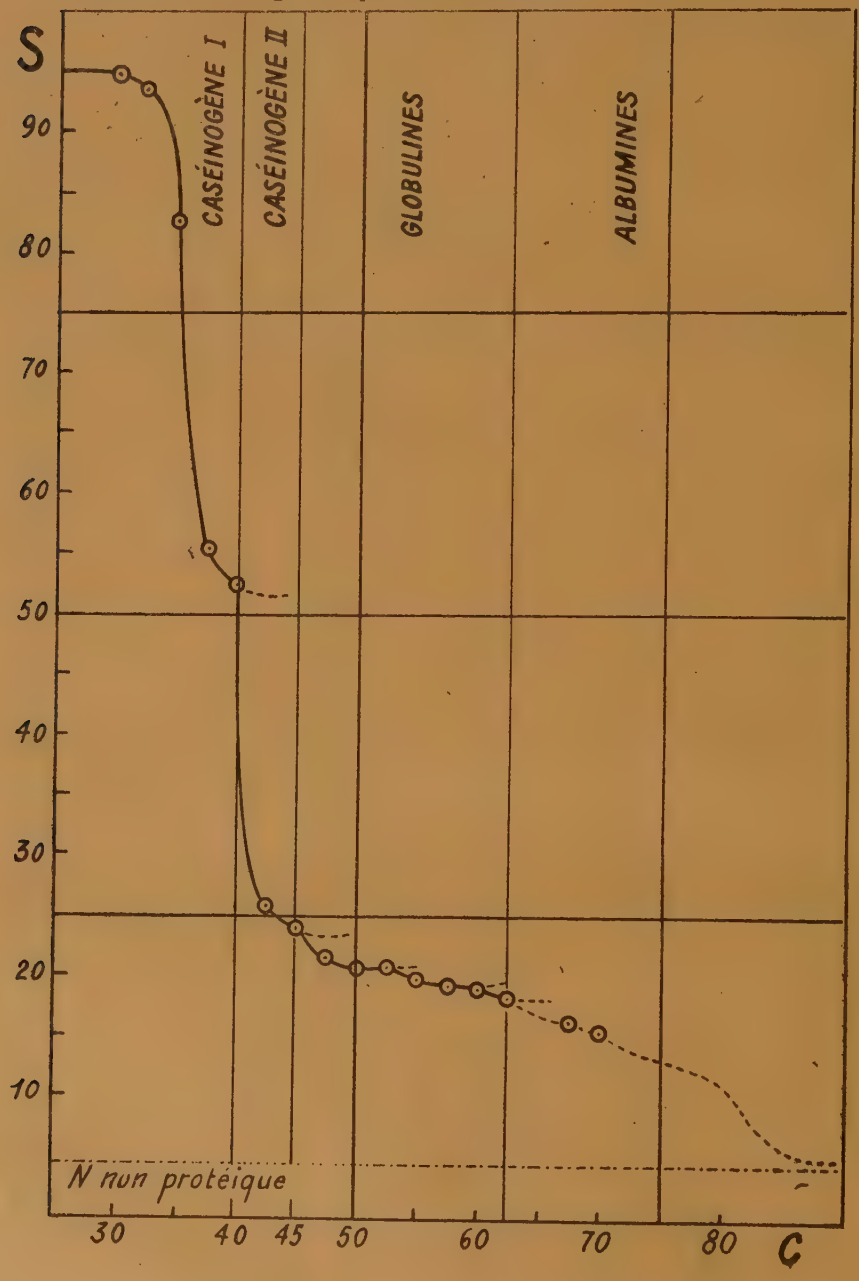
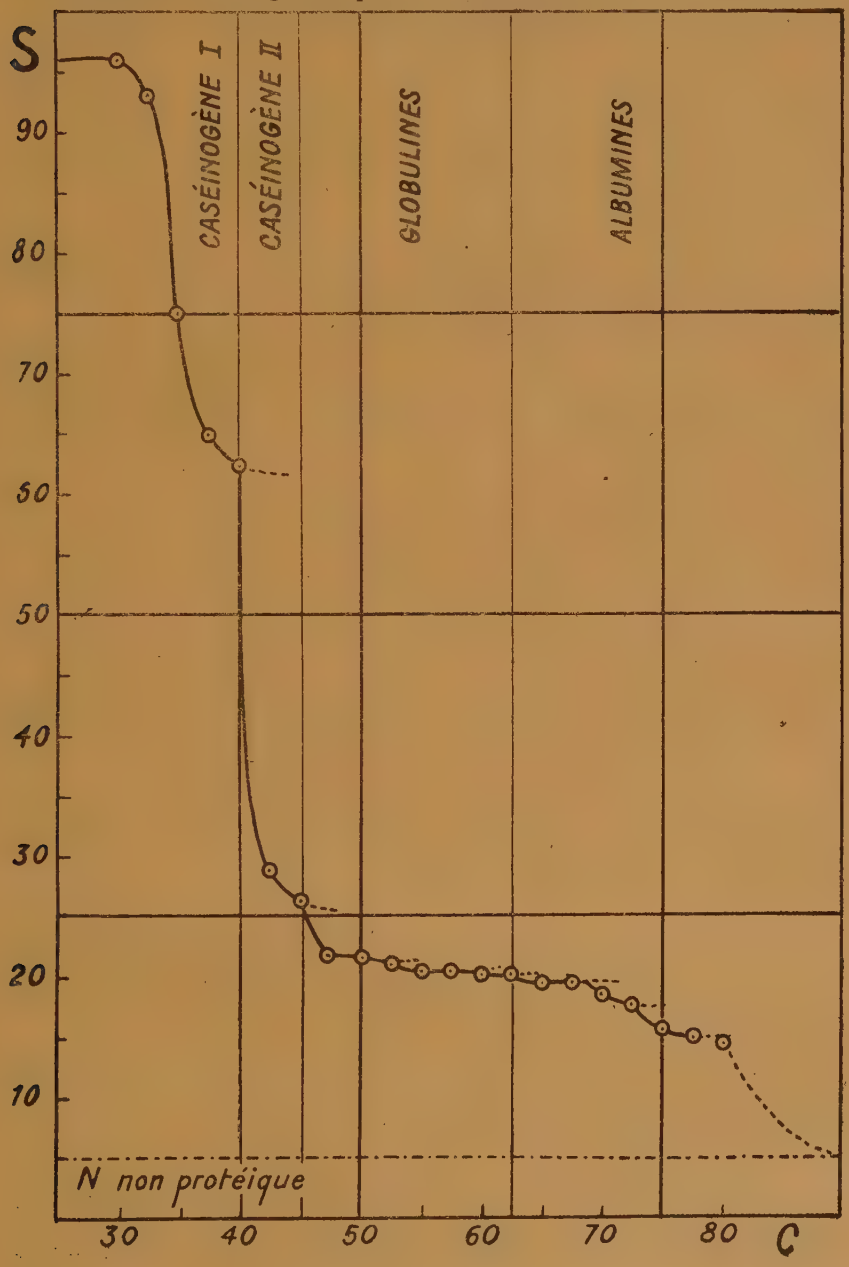


FIG. 10. — **Variations de la solubilité S des protéines totales d'un lait de** vache dilué au 1/5, en fonction de la concentration du milieu en mélange équimoléculaire de phosphates mono et dipotassique, à concentration croissante, à PH 6,5 et à 22°C.

Abcisses : C = p. 100 en vol. de PO4 KH2 + PO4 K2 H, 3,5 M.
Ordonnées : S = Mg de N p. 100 cm3 de filtrat.



milieu de ce dernier, et son refroidissement sous un courant d'eau quelques gouttes avant le virage. L'observation de ces précautions permet de se placer dans des conditions particulièrement constantes, qui confèrent aux chiffres obtenus le maximum de précision.

Expression des résultats. — Le nombre de cm^3 de soude trouvé pour chaque essai est déduit du chiffre obtenu pour le témoin T. La différence multipliée par 0,2 et divisée par le nombre de centimètres cubes correspondant à la prise d'essai, donne la teneur en azote par centimètre cube de filtrat.

Les tableaux XXVII et XXVIII expriment les données expérimentales dont nous sommes parti. On y trouvera rassemblés également les résultats correspondants.

Les figures 9 et 10 faisant suite à ces tableaux représentent graphiquement les résultats obtenus. Nous avons porté en abcisses la concentration en sels et en ordonnées les quantités de protéines demeurant en solutions exprimées en gr. d'azote protéique par litre de lait dilué au 1/5.

Discussion des résultats. — Par analogie avec la notation utilisée par Sörensen, les chiffres entre crochets correspondent en volume de la solution saline mère utilisée (PO4 KH2 + PO4 K2H, 3,5 M) contenu dans les milieux expérimentaux.

A partir de la concentration saline de [30], commence le relargage des protéines. Une première fraction précipite à [40], une autre à [45]. Suivent une série d'autres segments de courbes se succédant à de faibles intervalles de concentrations jusqu'à l'obtention d'un palier dont l'ordonnée est égale à la teneur en azote non protéique du milieu.

A priori, rien ne nous autorise à attribuer tel ou tel segment de courbe à la précipitation d'une protéine particulière du lait. Toutefois au pourcentage de [45] sur la courbe de la figure 10, correspond une teneur en azote de 0,710 gr. par litre de lait dilué au cinquième, alors que la même solution renferme 0,910 gr. d'azote protéique total. Cette fraction représente donc 78 p. 100 des protéines totales, ce qui est la proportion approximative de la caséine par rapport à ces dernières.

Cependant, ces présomptions ne peuvent constituer une certitude que nous ne pourrons acquérir qu'en évaluant la caséine par une autre méthode. Sur d'autres laits, nous avons floculé la caséine à raison de 0,2 cm^3 d'acide acétique pour 200 cm^3 de lait, et nous avons effectué en même temps une précipation à [45] sur un autre prélèvement du même lait. Après filtration nous avons minéralisé une partie aliquote de chacun de ces filtrats. Nous avons trouvé pour la plupart des essais les mêmes chiffres avec les deux métho-

des, suivant une approximation de 1 p. 100 au maximum, qui est de l'ordre de grandeur des erreurs expérimentales.

C'est donc bien la caséine qui précipite à 45 p. 100 de saturation.

A partir de 30 p. 100 commence le relargage.

Celui-ci affecte tout d'abord, comme nous venons de le voir, la caséine, dont les variations de solubilité, dans des milieux de concentration saline croissante, s'inscrivent graphiquement selon deux segments de courbes, traduisant vraisemblablement l'existence d'au moins deux constituants de ce type. Parmi ces derniers, le premier commence à précipiter à [30] et le second à [40]. Le relargage de la caséine est pratiquement terminé à [45].

A partir de cette concentration saline, le profil de la courbe de relargage s'aplatit notablement en raison des faibles quantités de protéines demeurées en solution. L'interprétation du graphique devient dès lors plus difficile, l'écart observé entre les dosages d'azote effectués sur deux filtrats consécutifs ne dépassant parfois de très peu la marge d'approximation de la technique utilisée. L'on peut cependant noter avec certitude le relargage progressif de deux groupes distincts de protéines hétérogènes dont l'un présente les caractères de solubilité des sérum-globulines et l'autre des sérum-albumines. Ce dernier commence à précipiter vers [62,5].

Ainsi qu'en fait foi la courbe de la figure 10, pour un taux d'azote total de 0.960 mmg. par cm^3 de lait dilué au cinquième, on a des teneurs en azote non protéique de 0,050 mmg. et de 0,910 mmg. d'azote protéique total. Ce dernier se répartit en azote caséique et en azote albumines + globulines dans une proportion de 0,710 mmg. pour la caséine et de 0,200 mmg. pour les protéines du lactosérum. Celles-ci se présentent dans un rapport de 3, correspondant à 0,050 mmg. de globulines et 0,150 mmg. d'albumines.

Evalués en grammes de protéines par litre on peut exprimer ces chiffres de la façon suivante :

Caséine : 22,36.

Protéines du lactosérum : 6,30.

Globulines : 1,57.

Albumines : 4,71.

L'autre courbe traduit des résultats analogues.

Ces proportions sont du même ordre de grandeur que celles déterminées par les différents auteurs.

Conclusions. — 1° Si nous nous en tenons à des considérations pratiques, nous devrons noter tout d'abord que nous dispo-

sons ainsi d'une technique de dosage de la caséine reposant sur un principe original de détermination dont l'application est particulièrement satisfaisante par sa simplicité et son exactitude.

Il suffit de précipiter la prise d'essai à 45 p. 100 de phosphates mono et dipotassique. On peut se contenter de doser l'azote contenu dans le précipité. Il est préférable d'évaluer dans le filtrat l'azote résiduel, et, par différence avec le taux d'azote total fourni par une détermination directe, on obtient ainsi la proportion de caséine.

Nous avons utilisé à des fins systématiques de recherches des prises d'essai de 4 cm^3 de lait, mais il est aisé de se rendre compte que 0,8 cm^3 suffisent pour une simple détermination de la caséine. Dans un tube à centrifuger, on dispose 1,8 cm^3 de mélange salin, 1,4 cm^3 d'eau distillée et après agitation 0,8 cm^3 de lait, on aura l'azote total et la différence entre les deux résultats donnera la teneur en caséine.

On bénéficie ainsi d'une méhode sensible et précise, puisque l'erreur relative est inférieure à 1 p. 100.

Par la même méthode, il est possible d'apprécier la globuline et l'albumine.

2° Il ressort des résultats expérimentaux que nous avons présentés que la caséine est vraisemblablement un constituant hétérogène composé de 2 fractions au moins, dont l'une est un peu plus importante que l'autre.

Il est plus difficile de se rendre compte du nombre des fractions globuliniques et albuminiques, mais les premières semblent être au nombre de 3 ou de 4 au moins, et les autres sont certainement plus de 6.

CONCLUSIONS GENERALES

Nous avons, au cours de ce travail, étudié des questions assez différentes. Après avoir brièvement rappelé les résultats obtenus, nous essaierons de tirer les conséquences qui peuvent en résulter, sans d'ailleurs en dissimuler le caractère hypothétique éventuel.

I. — L'UTILISATION DE L'ENSEMBLE DE MICROMETHODES PROPOSEES POUR L'ANALYSE DU LAIT DE FEMME

Tout d'abord, nous avons établi que l'on pouvait, grâce à des microméthodes, doser les principaux éléments du lait de femme sur une prise d'essai restreinte.

Nous avons pu opérer sur 1 cm^3 pour les lipides du lait, grâce à l'élaboration d'une technique qui fait appel à un appareil s'inspirant de celui de KUMAGAWA, et qui utilise, comme LE COMTE, la dessication du lait par le sulfate de sodium anhydre.

L'adaptation au lait de la méthode de RUSZNIACK nous a permis avec de légères modifications expérimentales d'apprécier le taux des chlorures sur 0,1 cm^3.

Nous avons adopté, pour le dosage du lactose, la méthode iodométrique de DUMAZERT, en utilisant la défécation à l'hydrate de cadmium sur 0,1 cm^3 de lait.

0,3 cm^3 de cette humeur suffisent, pour obtenir la valeur des protéines totales au moyen de la technique de Kjeldahl.

Enfin, nous avons complété cet ensemble technique en indiquant qu'on peut connaître le taux d'extrait sec et de cendres en opérant sur une prise d'essai de 0,1 cm^3 avec des méthodes courantes.

Nous avons montré le bénéfice que l'on pouvait retirer de l'emploi des microdosages dont nous avons donné la description. Le principal avantage réside dans la faible quantité de lait qui suffit à ces déterminations. Encore faut-il préciser que l'ensemble des dosages, si l'on veut en effectuer une série, conduit à une économie relative encore plus grande. Résumons les prises d'essai qui sont nécessaires pour chaque détermination.

1° Déterminations nécessaires pour la détection des fraudes :

1) Mouillage simple : détermination de la C.M.S.m. :

Protéines : 0,3 cm³
Lactose : 0,1 cm³ Total 1,5 cm³
Chlorures : 0,1 cm³
Beurre : 1 cm³

2) Mouillage avec de l'eau saccharosée :

Pouvoir réducteur avant hydrolyse : 0,1 cm³
Pouvoir réducteur après hydrolyse : 0,1 cm³

Il est bien évident que la détermination du pouvoir réducteur avant hydrolyse rendra inutile une appréciation spéciale du lactose. Il faudra donc en tout : 1,7 cm³ au lieu d'une trentaine de cm³ au moins qu'exige une analyse courante.

2° Appréciation de la valeur alimentaire d'un lait :

Une analyse normale effectuée pour connaître la valeur d'un lait dans d'autres conditions que dans les centres de donneuses de lait exige seulement les déterminations suivantes :

Protéines totales : 0,3 cm³
Beurre : 1 cm³
Lactose : 0,1 cm³
Chlorures : 0,1 cm³
Extrait sec : 1 cm³

Soit 2,5 cm³. Encore l'évaluation de l'extrait sec n'est-elle pas indispensable, et l'analyse donnera des renseignements aussi satisfaisants si elle ne porte que sur les éléments suivants :

Protéines totales : 0,3 cm³
Beurre : 1 cm³
Lactose : 0,1 cm³
Chlorures : 0,1 cm³

C'est-à-dire que l'ensemble de ces déterminations n'exigera que 1,5 cm³.

II. — SUR LA NATURE ET SUR LE ROLE DES SUCRES COMBINES DU LAIT DE FEMME

Les techniques que nous avons préconisées dans la deuxième partie sont également à l'échelle microanalytique. Elles nous ont permis de conclure à l'existence, dans le lait humain, de deux fractions glucidiques distinctes dont les variations sont indépendantes :

La première, que nous avons appelée, comme Dumazert et Penet (69) l'ont fait pour le sang, « fortement combinée », est

libérable uniquement par les acides forts tels que l'acide sulfurique N — cette libération est complète au bout de 3 h. 30 d'hydrolyse —. Elle est donc unie avec les protéines par des liaisons stables. Elle renferme de la glucosamine et ne fermente pas sous l'action de la levure de bière. Sa valeur moyenne est de 1,50 gr.

La seconde fraction dénommée « sucres faiblement combinés », participe à des liaisons labiles avec certains constituants du lait. En effet 3 h. 30 d'hydrolyse par les acides faibles comme l'acide acétique 0,2 N suffisent pour l'obtenir complètement. Elle ne contient pas de glucosamine, mais un tiers est fermentescible. Son taux dans le lait est en moyenne de 1,20 gr.

1. — Hypothèse sur la nature de ces sucres

Nous avons montré que la fraction fortement combinée contient de la glucosamine, et que, dans les constituants d'hydrolyse des sucres faiblement combinés, se trouvent un ou plusieurs oses fermentescibles.

Ces derniers glucides ne seraient-ils pas assimilables au complexe que M. Husset-Bierry (104) a isolé du lait de femme ? Plusieurs faits tendraient à confirmer cette façon de penser :

D'abord la défécation cadmique, comme la déprotéinisation mercurique, retient une substance, qui, dans les deux cas, se révèle comme possédant des caractères glucidiques.

Les dosages du lactose, effectués avec d'autres désalbuminants que l'hydrate de cadmium ou les sels de mersure, par exemple l'acide silico-tungstique, donnent des chiffres sensiblement plus élevés, ce qui prouve que ce réactif serait susceptible de rompre les liaisons labiles qui unissent ces glucides aux protéines du lait. Notons par ailleurs que c'est au moyen d'agents analogues, comme l'acide trichloracétique, que C. Dumazert et M. Levy (65) ont pu trouver un moyen d'isoler les sucres faiblement combinés du sang. Ce fait est en accord avec les résultats que nous avons obtenus en dosant le pouvoir réducteur développé dans certains essais ; nous avons ajouté dans ceux-ci de l'acide acétique sans les porter au bain-marie, et nous avons observé que le pouvoir réducteur apparu n'est pas nul. Autrement dit, au temps zéro de l'hydrolyse à chaud, la courbe traduisant les variations des sucres faiblement combinés en fonction du temps, ne part pas de l'axe des abcisses (voir figures 6, 7, 8). Nous constatons d'autre part que le même phénomène se reproduit dans nos expériences sur l'hydrolyse sulfurique (v. p. 94). Donc, à froid, l'influence des acides serait suffisante pour provoquer la dissociation d'une partie de la fraction faiblement combinée. A plus forte raison, les acides plus énergiques ou en concentration plus forte seraient-ils capables de

libérer une quantité encore plus grande de sucres. Les chiffres fournis par M. Husset-Bierry sont du même ordre de grandeur que les nôtres. Enfin cet auteur a mis en évidence la présence de phosphates dans le complexe qui a contribué à lui faire admettre l'existence d'un ester phosphorique acido-labile.

Ainsi le complexe isolé par cet auteur, tout au moins en ce qui concerne la partie acido-labile, serait-il comparable à notre sucre faiblement combiné.

Nous nous permettrons de signaler par ailleurs que Polonovski et Lespagnol (168 et in 178) isolent le gynolactose et l'allolactose à la suite de longs épuisements par l'alcool. Or ce réactif est fort capable de rompre certaines liaisons lâches unissant peut-être ces glucides aux protéines du lait. D'autre part, l'examen polarimétrique fournit des résultats supérieurs au dosage du lactose, par exemple par la méthode de Bertrand précédée d'une défécation cadmique ; on pourrait peut-être attribuer ce fait à l'action hydrolysante à froid des réactifs utilisés pour la clarification du milieu, sans en rendre responsable pour cela un sucre libre préexistant dans le lait.

2. — Hypothèses sur le rôle des sucres combinés

L'existence du sucre combiné lacté dont une fraction labile est facilement mobilisable pose des problèmes physiologiques importants et permet peut-être de fournir des renseignements intéressants, en particulier sur les rapports qui existeraient entre ces sucres avec des sucres combinés sanguins, et sur l'origine du lactose. Il est bien évident que les hypothèses que nous envisagerons mériteraient d'être confirmées par des expériences ultérieures. Nous avons cependant jugé intéressant de faire entrevoir les modifications que pourrait apporter l'existence de glucides combinés lactés aux conceptions actuellement admises sur ces diverses questions.

Rapports entre les sucres combinés lactés et sanguins. — Les nombreuses ressemblances qui rapprochent le sang et le lait (v. p. 22) incitent à pousser plus loin les analogies dans les rapports et les échanges qui peuvent exister entre leurs sucres combinés. Le sucre faiblement combiné du sang, grâce à sa particulière mobilité, ne serait-il pas particulièrement susceptible de donner naissance au sucre labile lacté ? Des phénomènes de phosphorylation interviendraient peut-être dans ces réactions. Dans la partie acido-labile du complexe qu'elle a isolé, M. Husset-Bierry a montré l'existence d'un esther phosphorique du galactose. Les protéines lactées sont fortement phosphorées, et, d'autre part, la cellule mammaire est facilement perméable à la globuline (Riming-

TON) (182). Ainsi, c'est par l'intermédiaire de protéines que ce ferait le transfert et les remaniements ayant pour but la formation de ses sucres. En même temps que s'élaboreraient les protéines du lait à partir des albuminoïdes sanguins aurait lieu la transformation de ces glucides. On pourrait donc grossièrement envisager l'origine de ceux-ci comme procédant d'un phénomène concomittant et dépendant de la transformation des protéines sanguines en protéines lactées.

M. HUSSET-BIERRY (104) a remarqué chez les femmes en lactation atteintes de diabète sucré un abaissement du taux de glucoprotéides sanguins en corrélation avec une augmentation du taux de glucose circulant. Cet auteur signale en outre que la glande mammaire réagit en transformant en lactose les glucides qui lui sont apportés. Il serait donc intéressant, selon elle, de chercher si l'on n'observe pas une variation du sucre protéidique lacté dans le sens d'une augmentation de son taux dans le lait, son excès se retransformant en lactose.

Par contre, dans le diabète consomptif l'insuline ne modifie pas la teneur du lait en lactose, pas plus que celle du sucre protédique sanguin (H. BIERRY). Si l'on admet la dépendance dans laquelle les glucoprotéides sanguins tiennent les sucres combinés du lait, cette insensibilité à l'insuline des premiers retentirait sur les seconds et par là sur la sécrétion du lactose.

Nous allons d'ailleurs envisager comment on peut concevoir l'origine de celui-ci en fonction des rapports entre les sucres protéidiques du sang et ceux du lait.

Origine du lactose. — L'historique de cette question a été traitée par M. HUSSET-BIERRY dans une étude très détaillée. Il résulte des travaux des différents auteurs que le lactose a été envisagé comme provenant de la transformation directe du glucose circulant dans le sang et comme procédant de phénomènes plus compliqués. Mais comment auraient lieu ces réactions ? Pour répondre à cette question, les biochimistes se sont demandés quelle était la nature des sucres éliminés dans l'urine ou existant dans le sang de la femme enceinte.

Certains prétendent avoir mis en évidence la « glycosurie » physiologique de la femme nourrice (BLOT) (26), d'autres nient la présence de glucose dans l'urine de la femme enceinte. WATKINS (238) admet l'existence du lactose dans l'urine et dans le sang, opinion contestée par d'autres auteurs. M. HUSSET-BIERRY conclut que si ante partum, le glucose peut être parfois présent dans l'urine, immédiatement après l'accouchement ce glucose est remplacé par du lactose. Le seul sucre caractérisable chez la femme nourrice serait le lactose. Cependant, ce diholoside est difficilement décelable dans le sang au même moment.

Mais quelles seraient les sources du lactose lui-même ?

A l'hypothèse de la transformation exclusive du glucose sanguin en lactose, certains auteurs ont préféré celle du sucre protéidique sanguin générateur de galactose, directement assimilable pour la synthèse du lactose (Foa) (80). La première conception est développée dans les travaux de Blackwood et Stirling (24). Mais M. Husset-Bierry, qui rapporte ces recherches, reste sceptique : « L'abaissement notable du sang veineux mammaire en glucose chez l'animal en lactation peut-il être attribué uniquement à la secrétion du lactose » ? D'après elle, cet abaissement peut être imputé en partie à l'augmentation des besoins énergétiques de la glande en activité, et d'autre part le sucre protéidique sanguin est susceptible lui aussi d'être responsable, dans une certaine mesure, de la diminution de taux de glucose. Ce fait semble, selon nous, appuyer notre hypothèse : l'abaissement du glucose peut être dû effectivement à une augmentation de la valeur du sucre protéidique sanguin, destiné à fournir un accroissement de la teneur des glucoprotéides lactés qui seraient ultérieurement transformés en lactose.

Signalons les remarques de quelques auteurs qui viennent confirmer cette façon de voir. L'insuline chez les nourrices dont l'alimentation est normale entraîne une hypoglycémie, mais aucune modification du taux du lactose ; l'excès d'hydrates de carbone dans l'alimentation ne semble pas utilisé en faveur de la sécrétion du lactose. (Banu Heresco) (6).

Dans l'un et l'autre cas, cette constance du lactose s'expliquerait peut-être en considérant le sucre faiblement combiné du lait comme jouant un rôle de réserve facilement mobilisable, analogue à celui du glycogène dans le foie ou des glucoprotéides sanguins. L'insuline ou une alimentation hypersucrée ne retentiraient pas sur le lactose directement, mais sur les sucres labiles du lait dont il serait intéressant d'apprécier à cet instant la valeur. Au moment du besoin, ces derniers restitueraient les éléments dont la glande mammaire feraient la synthèse pour l'élévation du taux du lactose.

On pourrait concevoir ainsi l'origine du lactose comme procédant d'un mécanisme analogue à celui que propose Marfan (137) qui affirme que le foie quand il fonctionne accumule dans son tissu du glycogène qu'il transforme en glucose ; celui-ci passe dans le sang, et du sang au sein, où il est transformé en lactose ; mais d'après notre hypothèse, les intermédiaires seraient différents : le sucre de réserve serait protéique et l'hydrate de carbone précurseur du lactose serait constitué par les glucoprotéides lactés.

Petersen et Shaw (163) mettent en présence du glucose, de l'acide lactique et du tissu de glande mammaire. D'après eux, le

défaut de rapport entre la quantité de glucose et d'acide lactique enlevés au sang par la glande à différentes périodes permet de supposer un autre mécanisme dans la synthèse du lactose. Ils expliquent ces variations par un dépôt d'hydrates de carbone dans la glande et prétendent isoler dans celle-ci du glycogène. Ce dernier serait formé de sucre sanguin et mis en dépôt dans la glande. Il constituerait une source de précurseurs du lactose. Ces vues sont singulièrement proches des nôtres, glycogène ou sucre combiné, ce serait toujours une réserve à laquelle ferait appel la glande mammaire pour la synthèse du lactose. La constitution de cette réserve aurait lieu grâce aux glucides sanguins sous la forme protéidique.

On peut se demander cependant de quelle façon aurait lieu la transformation des sucres précurseurs du lactose quels qu'ils soient.

Reprenons l'historique de M. Husset-Bierry : Müntz (152) avait émis l'hypothèse que le lactose se formerait par union dans la mamelle du glucose d'origine sanguine et du galactose d'origine alimentaire. D'autres biochimistes ont pensé que le glucose seul donnait naissance au lactose. L'isomérisation du glucose en galactose a été difficile à mettre en évidence in vitro, même en utilisant l'inversion de Walden (Robison) (186). Helferich (98) a fait intervenir l'action « d'isomérases » auxquelles aurait recours la glande mammaire. La synthèse aurait lieu en deux temps :

$$\alpha \text{ glucose} \rightleftharpoons \beta \text{ galactose}$$

$$\alpha \text{ glucose} + \beta \text{ galactose} \xrightleftharpoons{\beta \text{ galactosidase}} \text{lactose} + H_2O$$

Mais cette théorie ne tient pas compte du galactose présent dans le sucre protéidique du sang. Les difficultés que tant d'auteurs ont rencontrées dans la détermination du « lactose précursor » non réducteur s'expliqueraient si on admet que le générateur immédiat est constitué par le sucre protéique lacté provenant du sucre protéidique sanguin.

N'oublions pas que tous les deux possèdent de la glucosamine et que le sucre faiblement combiné du lait renferme vraisemblablement du glucose comme celui du sang. Ce dernier contient du galactose. La fraction acido-labile du complexe de M. Husset-Bierry renferme du galactose comme les glucides protéiques labiles du sang. Rappelons d'autre part que la caséine, la lactalbumine, sont également caractérisées par la présence de galactose. Il n'y aurait donc rien d'impossible à ce que le glucose et le galactose du sucre combiné aux protéines du sang ne subissent à l'intérieur de la cellule mammaire les transformations nécessaires à la synthèse du lactose.

Tant de contradictions soulevées dans les études tentées sur l'origine du lactose seraient éclaircies en admettant le schéma suivant :

glucose libre ⇄ sucre protéidique sanguin ➵ sucre protéidique lacté ➵ lactose libre.

On peut admettre peut-être des phénomènes de reversibilité entre les trois derniers termes.

Ainsi, la constance de la composition du lait en lactose, malgré l'influence de facteurs qui devraient la modifier tels que l'invasion soudaine d'hydrates de carbone chez une femme en lactation (Porcher) (171) ou d'autres éléments de variation que nous avons cités plus haut (insuline etc...), correspondrait à une variation des sucres faiblement combinés du lait en un phénomène inapparent.

Les sucres combinés lactés, et en particulier la fraction faiblement combinés, pourraient donc être considérés comme une réserve de lactose facilement mobilisable, la glande mammaire puisant dans cette réserve quand le besoin s'en fait sentir, emmagasinant les glucides quand le sang lui en apporte trop. On aurait ainsi affaire à une sorte d'intermédiaire entre la cellule mammaire et le reste de l'organisme dont la glande est, à la différence des autres organes, assez bien séparée, permettant la transformation du lactose en excès en glucose (dans le cas de l'ablation des glandes mammaires par exemple), et inversement, par le canal des glucoprotéides sanguins et lactés.

Variations du sucre protéidique lacté. — Nous observons que le taux des sucres protéiques du lait de femme n'est pas constant. Faut-il admettre que les variations qu'ils présentent sont arbitraires ? Nous pensons au contraire que les lois d'équilibre qui régissent la composition du lait doivent être étendues à cet élément. Il est donc fort possible que la teneur en glucoprotéides du lait soit influencée par la valeur des autres éléments, et qu'ils doivent être avec ces derniers dans des proportions qui ne sont pas indifférentes.

Le Dr J. Chaptal (40) signale, au quatrième mois de l'allaitement maternel, l'apparition de phénomènes d'intolérance suraiguë chez un nourrisson. L'analyse n'avait révélé aucune anomalie. Il n'est pas impossible que ces troubles soient attribuables à une disproportion entre les constituants normalement analysés et celle de sucres combinés.

Ceci explique peut-être que les efforts jusqu'ici tentés pour humaniser le lait de vache n'aient jamais été couronnés d'un succès complet, la teneur en sucres protéidiques et la nature de ces derniers dans le lait de vache n'étant pas forcément semblables. La technique des courbes de solubilité que nous avons d'ailleurs

employée pour l'étude des protéines du lait de vache donnerait à cet égard des renseignements utiles et permettrait de faire connaître, après des hydrolyses analogues à celles que nous avons déjà pratiquées, quelles sont les fractions protéiques responsables de la plus haute teneur en sucre protidique.

La combinaison de ces deux moyens d'investigation fournirait également chez les autres espèces des données permettant de procéder à des comparaisons instructives sur la spécificité des laits envisagés.

Pour revenir au lait humain qui nous intéresse plus particulièrement, on pourrait suivre avec fruit les variations du sucre protéidique en fonction de celles des autres constituants.

Les plus importants à cet égard sont le lactose et les protides.

M. Husset-Bierry note que le lactose, qui est en faible quantité au moment de la sécrétion prénatale, subit encore des diminutions au moment de l'accrouchement pour croître ensuite rapidement au cours des dix jours qui suivent la délivrance et se stabiliser ensuite. Il serait curieux de se rendre compte si la diminution ou l'augmentation du lactose ne correspond pas à des variations inverses des sucres protéidiques.

Brown, Macy, Nims et Hunscher (35) observent que l'azote décroît rapidement pendant les six premiers mois de la lactation et devient ensuite constant. Dans le cas d'intolérance dû à une insuffisance des protides que signale Paccard (156), on aurait pu se rendre compte si cette modification de la valeur des protides n'entraînait pas de répercussion sur le taux des sucres qui leur sont combinés.

Si l'on se place du point de vue de la « mère », tel ou tel trouble anormal ou pathologique amènera dans le lait telle modification et pas une autre. Il serait intéressant de constater si les variations du sucre protéidique ne correspondent pas à ces troubles.

Ce ne serait pas invraisemblable quand on se rappelle le rôle anti-infectieux que jouent les sucres dans l'organisme. Aussi y aurait-il intérêt à suivre les variations du sucre protéidique lacté au cours des diverses maladies que peuvent présenter les femmes en lactation : tuberculose, syphilis et surtout évidemment diabète.

Ainsi le rôle du sucre protéidique du lait de femme pourrait-il être mis en évidence dans bien des cas, qu'il s'agisse du problème de l'origine du lactose, des rapports avec les glucoprotéides sanguins ou des problèmes physiologiques et pathologiques qui en découlent nécessairement.

III. — CONSEQUENCES THEORIQUES ET PRATIQUES DE L'APPLICATION DU LAIT DE VACHE DE LA METHODE DES COURBES DE RELARGAGE

L'utilisation de méthodes semblables à celles qui ont été préconisées dans l'étude des protéines sanguines, nous a permis de confirmer l'analogie qui existe entre les humeurs sanguine et lactée. En effet l'établissement et l'étude des courbes de relargage des protéines du lait par les sels neutres (PO_4K_2H + PO_4KH_2 3,5 M) à pH et température constants, ont conduit aux résultats suivants : deux fractions caséiques précipitent respectivement dans des milieux renfermant 40 et 45 p. 100 en volume de solution saline.

Il ressort de ces faits expérimentaux :

1° Au point de vue analytique, la caséine peut être dosée par ce moyen en floculant une quantité donnée de lait à 45 p. 100 de phosphates et en estimant l'azote correspondant, la séparation albumine globuline étant une chose également possible.

2° Au point de vue théorique, la caséine se révèle comme un protide non homogène, composée d'au moins deux constituants, « la » lactoglobuline et « la » lactalbumine contenant également plusieurs fractions de solubilité différente, faits qui fournissent des données supplémentaires en faveur de l'analogie qui existe entre le sang et le lait.

Au point de vue de la préparation de la caséine, cette technique constitue les éléments d'un procédé plus pratique que beaucoup des méthodes employées couramment, surtout en ce qui concerne les phases de la séparation et des lavages.

La précipitation s'effectuerait à 45 p. 100 de phosphates ; on redissoudrait le précipité dans une quantité connue d'eau, on relarguerait à nouveau par addition d'une quantité de solution saline correspondant à ce pourcentage, et l'on répéterait deux ou trois fois ce mode opératoire destiné à éliminer les protéines autres que la caséine. Les phosphates seraient séparés par dialyse, et le produit ainsi obtenu pourrait être desséché par les réactifs les moins susceptibles d'altérer la structure de la caséine, en particulier par la technique permettant l'obtention des protéines plasmatiques desséchées en vue de perfusion sanguine. On parviendrait ainsi à un produit qui serait très semblable à la substance existant dans le lait, les sels neutres n'ayant aucune influence dénaturante sur la caséine, ainsi que nous l'avons signalé plus haut (v. p. 125). On éviterait l'observation des conditions particulièrement rigoureuses qu'exigent les méthodes habituelles pour arriver à une protéine de composition constante. Avec un mode opératoire

particulièrement simple, il serait donc possible de préparer une caséine ayant des propriétés remarquablement stables qui permettraient de préconiser son emploi en pharmacie par exemple pour la synthèse de complexes ferreux, iodés, alcaloïdiques, dont les vertus thérapeutiques sont indiscutables.

3° Il serait intéressant de réaliser des courbes de solubilité sur les protéines du lactosérum, les schémas précédents ne pouvant donner de renseignements très précis en raison de la faible concentration en azote de ces protéines.

Nous avons à cet effet opéré une concentration des protéines du petit lait obtenu après élimination de la caséine par une précipitation à 45 p. 100. Par congélation fractionnée, les cristaux de glace qui se forment au cours du refroidissement étant enlevés au fur et à mesure, nous avons ainsi effectué une réduction au tiers du volume initial. En partant de solutions possédant une teneur en azote considérablement plus élevée que le lactosérum initial, nous avons pris ensuite les dispositions expérimentales analogues à celles qui sont résumées dans les tableaux XXVII et XXVIII, mais nous avons fait varier les concentrations en sels de 40 à 90 p. 100. Le temps nous a malheureusement manqué pour mener à bien ces expériences, mais l'accroissement de la teneur en azote aurait certainement eu pour effet de modifier la pente de la courbe et de rendre ainsi visibles les points d'inflexion de chaque fraction.

Pour observer les propriétés des globulines et des albumines, précipitées, il aurait alors suffi de les isoler entre les limites de floculation indiquées par les courbes, et de les étudier après élimination des phosphates par dialyse conformément au processus utilisé par Roche, Derrien et Mandel (194) dans le cas des protéines sériques. Supposons que nous ayons voulu examiner plus particulièrement la ou les globulines précipitant entre 57,5 et 62,5 p. 100 de phosphates : sur le filtrat obtenu après précipitation des protéines floculant à 57,5 et au-dessus, nous aurions effectué une autre précipitation à la concentration de 62,5 p. 100 ; nous aurions été ainsi conduit à la formation d'un précipité qui, lavé et dialysé aurait fourni la matière première nécessaire ; sur celle-ci, il aurait été facile d'établir des courbes de solubilité secondaires permettant de parvenir à des données précises sur la constitution de la fraction envisagée ; il aurait été également aisé d'étudier les caractères physiques et chimiques de cette même fraction.

Il est bien évident que les mêmes méthodes pourraient être employées sur n'importe quelle autre fraction protéique du lait, sur la caséine par exemple. Ainsi sans altérer en rien l'intégrité des albuminoïdes du lait, on bénéficierait d'une technique permettant d'isoler successivement tous les constituants, d'en étudier les propriétés physiques et chimiques et de rechercher ensuite si chaque

fraction est elle-même susceptible de se scinder en d'autres parties.

On se rendrait ainsi mieux compte des points communs que cette protéine présente avec le fibrinogène du sang. Comme pour ce dernier, la coagulation du caséinogène nécessite la présence d'ions calcium. Des recherches, esquissées déjà par FLORKIN sur le fibrinogène, sont en cours au laboratoire du professeur ROCHE à l'aide des méthodes des courbes de relargage. Le lactosérum est lui aussi comparable au sérum sanguin ; comme lui, il contient des globulines et des albumines en nombre relativement considérable et dont les principales fractions précipitent à des pourcentages en phosphates semblables. Cette analogie doit vraisemblablement pouvoir être étendue aux protéines tissulaires (protoplasmiques) comme en témoignent les résultats des recherches de G. JAYLE, Y. DERRIEN et A. OURGAUD (107) sur les constituants protéiques du cristallin.

Ainsi se pose le problème de l'origine des protéines lactées. Ne préexistant pas dans les humeurs de l'organisme, la caséine par exemple serait élaborée d'après BASCH (9) par l'épithélium mammaire. REMINGTON (182) s'est appliqué à montrer que l'on pouvait considérer les protéines du sang comme servant à la synthèse de la caséine de la cellule mammaire — caséine qui ne serait d'après lui qu'une globuline phosphorylée. La facile perméabilité de cette cellule à la sérumglobuline plaide en faveur de cette thèse.

D'autre part, l'existence de sucres combinés aux protéines du lait — à rapprocher de la présence dans le sang de glucoprotéides — est dans une certaine mesure en accord avec cette manière de voir. Nous avons signalé plus haut la présence dans le lait de femme de ces sucres dont nous avons montré l'analogie avec la copule glucidique des protéines sanguines. L'isolement facile des constituants qui composent les protéines du lait permettrait sans doute de savoir quels sont ceux qui sont responsables de la plus grande quantité de sucres réducteurs, et des travaux analogues à ceux de HEWITT et de M. SÖRENSEN sur les protéines pures pourraient être effectués, présentant sur ces derniers l'avantage de faire appel à des fractions protéiques exactement délimitées ; au lieu d'attribuer à la caséine « en bloc » un certain pouvoir réducteur, on pourrait se rendre compte si telle ou telle fraction de cette protéine ne renferme pas la majeure partie des sucres combinés. Le dosage de ces derniers pourrait donc être directement tenté après hydrolyse sulfurique ou acétique suivant que l'on voudrait étudier le « sucre virtuel » ou les glucides totaux. On pourrait, au préalable, établir parallèlement aux courbes de précipitation des protéines les courbes exprimant les teneurs en glucides des protéines solubles aux diverses concentrations salines.

Au point de vue sérologique, il serait intéressant de localiser

les agglutinines qui caractérisent les différents laits humains, avec autant de spécificité que celles que renferment les sérums sanguins, et qui ont fait classer les sécrétions lactées en groupes comparables aux groupes sanguins (Dujarric de la Rivière et Kossovitch) (61).

Enfin, l'application au lait des différents mammifères de cette méthode d'analyse particulièrement sensible que constitue la technique des courbes de relargage permettrait peut-être de vérifier la validité de l'opinion de Porcher (174) selon laquelle les diverses espèces animales possèdent des caséines et des séroprotéines identiques : « Le lait est une entité sécrétoire... dont les grandes lignes sont toujours retrouvées quelle que soit l'espèce envisagée. » (172).

BIBLIOGRAPHIE

(1) ABDERHALDEN, BERGELL et DÖRPINGHAUS. — *Zeits. für phys. chem.*, 1904, *41*, 530.

(2) AGASSE-LAFONT. — Les applications pratiques du laboratoire à la clinique, 1920, Vigot Fr., édit., Paris.

(3) ALEXANDER. — *Z. physiol.*, 1898, *25*, 411.

(4) ASDELL (S.-A.), BROOKS (H.-J.), SALISBURY (G.-W.) et SEIDENSTEIN (H.-R.). — *Cornell University Experiment Station*, 1936, *198*, 32.

(5) AURNHAMMER. — *Archiv. für Kinderheilkunde*, 1909, in (*91*).

(6) BANU HERESCO. — Recherches sur la sécrétion lactée chez la femme. L'action de l'hypo et de l'hyperglycémie sur la composition du lait ; l'influence de l'insuline sur la sécrétion lactée. — *Le nourrisson*, 1925, 166.

(7) BAROT-HERDING (S.). — Les Centres collecteurs du lait de femme. Le Centre de donneuses de lait de la Maternité Baudelocque. *Thèse Doct. Médecine*, 1939, Paris.

(8) BARRAL (E.). — Précis d'analyse chimique qualitative, 1923, Baillière et Fils, éd., Paris.

(9) BASCH (K.). — Die Untersuchung des Kaseins in der Milchdrüse, 1898, *Jahrb. für Kindheit.*

(10) BAUDOIN (A.). — Le dosage des matières réductrices du sang. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1928, *10*, 979-1040.

(11) BEAU (M.). — Nouvelle théorie concernant l'action de la présure sur la caséine du lait. *Le Lait*, 1932, *12*, 618, et : Sur la théorie de la polymérisation de la caséine. *Le Lait*, 1939, *13*, 325-330.

(12) BEAU (M.). — La caséine et la présure. *Le Lait*, 1941, *21*, 113-117.

(13) BELLE (G.). — Recherches sur la croissance des mammifères. Ses relations avec la composition chimique du lait de la mère. *Le Lait*, 1931, *11*, 337-352, 456-473, 580-589, 725-737, 822-828.

(14) BETTINOTI (S.-I.). — El Lactarium. — *Imprenta Frascoli y Bindi-Cordoba*, 1936, 2559, Buenos-Ayres, cité in (*156*).

(15) BIERRY (H.). — Sur le dosage et la constitution du sucre protéidique du sang. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, *23*, 1175.

(16) BIERRY (H.). — Recherches sur les englobulines du sérum sanguin. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1942, *24*, 1125.

(17) BIERRY (H.) et RANC (A.). Sucre protéidique du plasma sanguin. *C. R. Ac. Sciences*, 1914, *158*, 278.

(18) BIERRY (H.) et MAGNAN (C.). Microdosage du sucre protéidique. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, *114*, 257.

(19) Bierry (H.) et Rathery (F.). — Introduction à la physiologie des sucres, 1935, Baillière et Fils, éd., Paris, 219-224.

(20) Bierry (M.). — Evaluation comparative du « sucre » dans le lait de femme par les méthodes cuprique et iodométrique. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, *122*, 857-858.

(21) Bigwood (E.-J.) et Vuillot (A.). — Des substances réductrices et fermentescibles combinées aux albumines du sérum sanguin. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, *97*, 187.

(22) Bigwood (E.-J.) et Vuillot (A.). — Du sucre sanguin dénommé protéidique. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, *96*, 417.

(23) Birk. — *Monatschrift für Kinderheilkunde*, 1923, *25*, 30.

(24) Blackwood (J.-H.) et Stirling (J.-D.). — *Biochem. Journ.*, 1932, *26*, 362-368.

25) Bleyer. — *Handbuch der Milchwirtschaft von Winkler. 1*, 6, 9, 19 in (*91*).

(26) Blot. — *C. R. Acad. Sc.*, 1856, *43*, 676.

(27) Bohn (D.-A.). — Les centres d'élevage de nourrissons. *La Médecine Infantile*, in *Le Lait*, 1934, *14*, 222-224.

(28) Bohn (D.-A.). — La pouponnière d'Anthony de l'Assistance publique de la Seine. *Revue médico-sociale de l'Enfance*, 1938, *6*, 492.

(29) Boll (M.) et Baud (P.). — Memento du chimiste. Partie industrielle, 1928, 2, Dunod, éd., Paris.

(30) Bordas (F.) et Touplain (F.). — Laiterie, 1913, Ch. Béranger, éd., Paris et Liége.

(31) Bougault (J.). *Journ. Pharm. et Chim.*, 1917, *16*, 159-178.

(32) Bouin (M.). — Nouveau critérium de la pureté des laits. *Soc. Biol.*, 1920, *83*, 1635.

(33) Brigando (J.). Recherches sur la caséine. *Thèse Doct. Sciences*, 1938. *Le Lait*, éd., Lyon. *Le Lait*, *13*, 657-673, 843-866, 965-989.

(34) Brigando (J.). La chimie de la caséine. Conférence faite à la Maison de la Chimie le 21 décembre 1942 (inédit).

(35) Brown (M.), Macy (I.-G.), Nims (B.) and Hunscher (H.-A.). — Human milk studies. A comparison of the composition of the milk from the two breasts. *Amer. Journ. Disease Children*, 1932, *43*, 1062-1076.

(36) Buruiana (L.). — Une nouvelle méthode de dosage des protides du lait. *Le Lait*, 1933, *13*, 1214-1221.

(37) Buruiana (L.). — *Bull. Soc. Chim. Romania*, 1937, *18*, 191-196.

(38) Butler (A.-M.), Blatt (H.) and Southgate (H.). — *Journ. of Biol. Chem.*, 1935, *109*, 755.

(39) Butler (A.-M.) and Montgomery (H.). — The solubility of the plasma proteins. I. Dependance on salt and plasma concentration, in concentrated solutions of potassium phosphat. *Journ. of Biol. Chem.*, 1932, *99*, 173-195.

(40) Chaptal (J.). — Accidents suraigus d'intolérance au lait maternel survenus au quatrième mois de l'allaitement. *Bulletin de la Société de Pédiatrie de Paris*, 1936, n° 3, 136.

(41) Cherbuliez (E.) et Meyer (F.). — Recherches sur la caséine. II. *Le Lait*, 1934, *14*, 132-145.

(42) Cherbuliez (E.) et Schneider (M.-L.). — Recherches sur la caséine. I. La caséine n'est pas un corps homogène. Etude de son fractionnement par le chlorure d'ammonium. *Le Lait*, 1933, *13*, 264-277.

(43) Clavera et Moreno Martin. — *An. Soc. Española Fis. Quim.*, 1935, *33*, 815-819.

(44) Cohn (E.-J.). — The physical chemistry of the proteins. *Physiol. Rev.*, 1925, *5*, 349-437.

(45) Cohn (E.-J.) and Bergreen (R.-E.-L.). — Studies in the physical chemistry proteins. III. The relations between the amino-acid composition of casein and its capacity to combin with bases. *The Journ. of gener. Physiology*, 1924, 7, 45.

(46) Couvelaire (A.). — Le Centre de Donneuses de lait de la Maternité Baudelocque. *Revue médico-sociale et de Protection de l'Enfance*, 1939, 7e année, n° 1.

(47) Danilewsky et Radenhausen. — Forschungen auf dem Gebiet der Viehhaltung, 1880, 2, 1, in (*95*).

(48) Davies (W.-L.). — *Analyst*, 1932, 57, 79-85.

(49) Deen (H.). Observations relatives au lait de femme en Nouvelle-Zélande. *Arch. Dis. Children*, 1931. An. in : *Bull. de l'Office interne d'Hygiène Publique*, 1932, *24*, fasc. 7.

(50) Demanez (M.-L.). — La constitution de la caséine. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, *112*, 1561.

(51) Demüth (F.). — *Bioch. Zeits*, 1924, *105*, 144.

(52) Deniges (G.). — Contribution à l'étude des lactoses. *Thèse Doct. pharmacie*, 1892, Paris.

(53) Deniges (G.), Chelle (L.) et Labat (A.). — Précis de chimie analytique. Editions médicales N. Maloine, 1931, 2, Paris.

(54) Denis (W.), Fritz et Talbot (B.). — Etude du lait de femme au point de vue de la teneur en lactose, en beurre et en matières protéiques. Communication au 31e Congrès de la Société Américaine de Pédiatrie, juin 1919, d'après *Le Nourrisson*, 1920, p. 368.

(55) Denis (W.) and Talbot Harvard (R.-B.). — A study of the lactose, fat and protein content of women's milk. *Med. School American Journ. Disease Children*, 1919, *18*, 93-100.

(56) Derrien (Y.). — Recherches sur les constituants protéiques du sérum. I. Etablissement et interprétation des courbes de relargage des protéines sériques par les sels neutres, à pH et température constants. *C. R. Soc. Biol.* 1944, *26*, 1091-1106.

(57) Dervichian. — *Journ. Chim. Phys.*, 1941, *38*, 68.

(58) Desbrousses (L.). — La dyspepsie du lait de femme. *Thèse Doct. Médecine*, Jouve et Cie, éd., 1930, Paris.

(59) Deval (L.). — Sur les variations de la composition du lait de femme pendant l'allaitement. *Bull. Soc. Pharm.*, 1905, p. 270.

(60) Duclaux. — Le lait. Etudes chimiques et microbiologiques. 1889, Paris

(61) Dujarric de la Rivière (R.) et Kossovitch (N.). — Groupes de lait. Le Nourrisson, janv. 1938, p. 22, et *Le Lait*, 1938, *18*, 474-481. *Bull. Académie de Médecine*, 1937, *117*, 370.

(62) Dumazert (C.). — Recherches sur le dosage de la glycémie. I. Déprotéinéisation par l'hydrate de cadmium et glycémie. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1935, *17*, 1163-1170.

(62 bis) DUMAZERT (C.). — Submicrodosage de l'azote dans la matière organique par la méthode de Kjeldahl. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, *20*, 1405-1418.

(63) DUMAZERT (C.). — Sur le microdosage iodométrique des aldoses et son application au dosage de la glycémie. *Thèse Doct. Pharmacie*, Marseille, 1936.

(64) DUMAZERT (C.) et BIERRY (M.). — Microdosage du lactose à l'aide du réactif mercuro-cadmique. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, *119*, 1029.

(65) DUMAZERT (C.) et LEVY (M.). — Sur la nature du « sucre sanguin faiblement combiné ». *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1943, *25*, 1274-1281.

(66) DUMAZERT (C.) et MARCELET (Y). — Sur un nouveau catalyseur de minéralisation en vue du dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, *20*, 201-216.

(67) DUMAZERT (C.) et MEMMI (A.). — Sur le rôle physiologique du sucre sanguin faiblement combiné. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1943, *25*, 1416-1420.

(68) DUMAZERT (C.) et PENET (G.-P.). — Contribution à l'étude du sucre sanguin. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, *128*, 913.

(69) DUMAZERT (C.) et PENET (G.-P.). — Sur la nature des glucides combinés du sang. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, *130*, 558.

(70) ELSON et MORGAN. — *Biochem. J.*, 1933, *27*, 1824.

(71) ENGEL. — *Handbuch der Milchkunde, von Sommerfeld*, 1909 573 in (*91*).

(72) ERICKSON (B.-N), GULICK (M.), HUNSCHER (H.-A.) and MACY (I.-G.). — *Journal Biol. Chem.*, 1894, *106*, 145-149.

(73) EXCHAQUET (L.). — Quelques résultats des divers modes d'allaitement. *Bull. de la Soc. de Pediatrie de Paris*, 1937, n° 9, 620.

(74) FELDWEG (P.). — *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 1936, *62*, 2054. An. in *Bull. de l'Office intern. d'Hygiène publique*, 1937, *29*, fasc. 12.

(75) FIGUIER. — *Gazette hebdomadaire de Médecine et de Chirurgie*, 1855, 763.

(76) FINKELSTEIN. — *Lehrbuch der Säuglingskrankheiten*, S. 20 in (*91*).

(77) FLEURY (P.). — Fiches techniques de Chimie biologique. Vega éd., 1933, Paris. Suppléments, Paris, 1938.

(78) FLEURY (P.) et MARQUEY (J.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1930, *12*, 61.

(79) FLORKIN (M.). — Studies in the physical chemistry of the proteins. VII. The solubility of fibrinogen in concentrated salt solutions. *Journ. of biol. Chem.* 1930, *87*, 629-649.

(80) FOA (C.). — *Arch. di Fisologica*, 1908, *5*, 533.

(81) FONTES (G.) et THIVOLLE (L.). — Recherches expérimentales sur le microdosage des substances réductrices du sang. *Bull Soc. Chim. biol.*, 1927, *9*, 353-445.

(82) FONTES (G.) et THIVOLLE (L.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1930, *12*, 264-283.

(83) FONTES (G.) et THIVOLLE (L.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1930, 22 262-269, 278-282.

(84) FORMULAIRE PHARMACEUTIQUE DES HÔPITAUX MILITAIRES. — Charles Lavauzelle, éd., 1918, 2. Paris.

(85) FORT (J.). — *Sbornick Ceskolov. Akad. Zemedelske*, 1938, *13*, 2 an. in : *Le Lait*, 1940, *20*, 73.

(86) FOULCRY. — *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1932, *39*, 172.
(87) FRANKEL (S.). — *Monatschrifte für Chem.*, *19*, 819 in (*162*).
(88) FRANKEL (S.) et JELLINEK. — *Biochem. Zeits.* 1927, *185*, in (*162*).
(89) FUJITA (A.) et IWATAKE (D.). — *Bestimmung des echten Blutzucker ohne Hefe. Biochem. Zeits.*, 1931, *243*, 43.
(90) GIBBENS (J.). — *The Lancet*, 1932, 222, n° 56-58, an. in *Presse Médicale*, 1932, n° 45.
(90 bis) GIRARD (C.). — Analyse des matières alimentaires et recherche de leurs falsifications. 1904, Dunod, éd., Paris.
(91) GÖLZ (H.). — La teneur en matière grasse du lait de femme. *Le Lait* 1940, *20*, 20-29 et 145-154.
(92) GREEN (A.A.), COHN (E.-J.) and BLANCHARD (M.-H.). — Studies in the physical chemistry of proteins. XII. The solubility of human, hemoglobin in concentrated salt solutions. *Journ. of Biol. Chem.*, 1935, *109*, 631-634.
(94) HAGEDORN (H.-C.) und JENSEN (B.-N.). — Zur Microbestimmung des Blutzuckers mittels Ferricyanid. *Biochem. Zeits.* 1923, *135*, 46-58 et : Die Ferricyanid methode zur Blutzuckerbestimmung. *Biochem. Zeits.*, 1923, *137*, 92.
(95) HAMMARSTEN (H.). — Om myölkystningen och de dervid verksamma fermenterna i magslemhinan. Om der kemiska forlöpet vid caseinats coagulation med löp. *Upsala läkare föreningens förhand lingar VII, IX Upsala*, 1872-73-74.
(96) HAMMARSTEN (O.). — *Acta. Reg. Soc. Scient. Upsal*, 1877, n° 10, in (*131*).
(97) HAMMARSTEN (O). — *Z. physiol.*, 1883, ch. 7, 227.
(98) HELFERICH (B.). — *Ergebn. Enzymforsch.*, 1933, 2, 74.
(99) HEWITT (J.-A.). Separation of serum albumine into two fractions *Biochem. Journ.* 1936, *30*, 2229-2236.
(100) HEWITT (J.-A.). — The polysaccharide content and reducing power of proteins and their digest products. *Biochem. Journ.*, 1938, *32*, 1554-1560.
(101) HOWE (P.-E.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1921, *49*, 93.
(102) HOYBERG (M.). — Influence de la vitesse de rotation des centrifuges dans le procédé Gerber. An. dans *Le Lait*, 1925, *5*, 440.
(103) HUBBARD (R.-S.) et BROCK (H.-J.). — *Journ. of biol. Chem.*, 1935, *110*, 411.
(104) HUSSET-BIERRY (M.). — Recherches sur la nature et le dosage des glucides du lait de femme. *Thèse Doct. Sciences*, 1943, Marseille.
(105) IOCHELSON. — *Voprossy Pitania*, 1935, *5*, 111-115.
(106) JACOBSEN (A.-P.). — *Skand. Arch. Physiol.*, 1938, *79*, 87.
(107) JAYLE (G.-E.), DERRIEN (Y.) et OURGAUD (A.-G). — Recherches sur les constituants protéiques du cristallin. *Journ. d'ophtalmologie*, 1942, n° 1.
(108) *Journal officiel* 13 mars 1937. Circulaire relative à l'organisation des centres de Donneuses de lait. Ministère de la Santé Publique (Paris le 8 mars 1937).
(109) KAYSER. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1891, p. 395.
(110) KAYSER (M. E.). — *Münchener medizinische Wochenschrift*, 1935, *28*, 1447.

(111) KAYSER (M.-E.)). — L'office collecteur de lait féminin à Erfurt. *Le Lait*, 1938, *18*, 805-812.

(112) KAYSER (M.-E.). Le « lactotest » de Koschuscharoff. *Deutsche medizinische Wochenschrift*, 1938, n° 9, 297. Traduit dans *Le Lait*, 1938, *18*, 930-934.

(113) KLING (A.). — Expertises chimiques, 1921, 2 vol. Dunod, édit.

(114) KOBRAK. — *Pflüger's Arch. ges. Physiol.*, 1900, *80*, 69 et *Beträge zur Kenntniss des Caseins der Frauenmilch*, Breslau, 1900 in (173).

(115) KONDO (K.) and YAMADA (T.). — α casein and β casein. *Journal Chem. Soc. Japan*, 1937, *13*, 791.

(116) KOSPATSCHER. — *Milchwirtschaftliches Zentralblatt*, 1922, *15*, in (156).

(117) KUGELMASS (N.-I). — *Amer. J. Digestive Distease Nutrition*, 1937, p. 523-525.

(118) KUMAGAWA (M.) und SUTO (K.). — Ein nenes verfahren zur quantitativen Bestimmung des Fettes und der unverseifbaren Substanzen in tierschem Material nebst der kritik einiger gebraülichen Methoden. *Bioch. Zeits.*, 1908, *8*, 212.

(119) LABARRE (F.). — Manuel du chimiste de Laiterie, 1926. Gauthier-Villars, éd. Paris.

(120) LAMPITT (L.-H.) et BUSHILL (J.-H.). — L'emploi du phosphate de calcium comme agent d'absorption différentiel pour l'élimination de la caséine du lait. *C. R.* 15e *Congrès Chimie Ind.*, 1936, p. 932-987.

(121) LANDWEHR. — *Zeits. Physiol. Chem.*, 1882, *6*, 74.

(122) LANDWEHR. — *Ber. d. d. chem. ges.*, 1886, *19*, 258.

(123) LAPIERRE (G.). — L'allaitement maternel. Conférence donnée le 30 mai 1931 aux médecins et aux infirmiers visiteurs de la Division de l'Hygiène de l'Enfance du Service de Santé. *Bull. d'Hygiène de la Cité de Montréal*, 1031, n° 3, *T. 17* et Le Lait, 1933, *13*, 1602-1068.

(124) LEPINE (R.). — Le sucre du sang, 1921, Alcan, éd., Paris.

(125) LEPINE R.). — Revue scientifique, 27 mai 1911, 641.

(126) LEREBOULLET (P.). — Les besoins alimentaires dans la première année de la vie. Conclusions de la réunion tenue à l'Organisation d'hygiène de la S. D. N., Genève, 11-12 déc. 1936. *Les Echos de la Médecine*, 1937, 1er fév. N° 3.

(127) Les méthodes officielles américaines d'analyse du lait. *Le Lait*, 1926, *6*, 54.

(128) LEVENE (P.-A.) and HILL (D.-W.). — *J. Biol. chem.*, 1933, *101*, 711.

(129) LEVENE (P.-A.) and ROTHEN. — On the molecular size of the carbohydrates obtained from egg's protein. *J. Biol. chem.*, 1929, *84*, 63.

(130) LINDERSTRÖM-LANG (K.).— Studies on casein II. Is casein a homogeneous substance ? *C. R. Trav. Labo. Carlsberg*, 1925, *16*, n° 47-60.

(131) LINDERSTRM-LANG (K.). — Studies on casein. III. On tre tractionation of casein. *C. R. Trav. Labo. Carlsberg*, 1929, *17*, n° 9.

(132) LINDERSTRÖM-LANG (K.) and SAKUJI KODAMA. — Studies in casein I. On the solubility of casein in hydrochlorid acid. *C. R. Trav. Labo-Carlsberg*, 1925, *16*, n° 47.

(133) LINDET. — Les matières albuminoïdes du lait. *Le Lait*, 1921, *4*, 161.

(134) Lobstein (J.-E.) et Flatters (M.). — Dosage des matières grasses du lait. *Le Lait*, 1933, *13*, 277-284.

(135) Machebœuf et Sörensen. — *C. R. Trav. Labo. Carlsberg*, 1927, *16*, n° 12.

(136) Manceau (P.), Revol (L.) et Paccard (R.). — Le dosage des chlorures dans le lait de Femme. *Soc. de Pharmacie de Lyon;* 11 juin 1937.

(137) Marfan (A.-B.). — Traité de l'allaitement, p. 30. Masson et Cie, éd. 1920, Paris.

(138) Massot (A.) et Lestra (H.). — Le dosage des chlorures dans les laits *Annales des Falsifications et des Fraudes*, 1935, n° 324, 608.

(138 *bis*) Mathieu (G.). — De l'influence des facteurs climatiques sur la constante moléculaire simplifiée et corrigée du lait. *Thèse Doct. Pharmacie*, 1939, Marseille.

(139) Mathieu (L.) et Ferré (L). — Caractérisation du mouillage des laits par une constante de concentration moléculaire simplifiée. *Annales des Falsifications et des Fraudes*, 1914, 7, 12-21.

(140) Mayerhofer et Prjban. — *Wiener . Klinische Wochenschrift* 1909, N° 26.

(141) Mc-Dowall (F.-H.) and Dolby (R.-M.). — *New-Zealand Journ. Sc. Tech.*, 1936, *17*, 619-637.

(142) Mc-Dowall (F.-H.) and Mc Dowell (A.-K.-R.). — Détermination de la caséine par titration au formol exécutée après précipitation à l'acide (Publ. n° 70 de l'Inst. de Rech. lait de Nlle-Zélande) *The Analyst*, *61*, 387-390 in *Le Lait*, 1937, *17*, 974.

(143) Mc Kee (R.-H.) and Gould (S.-P.). — *Joun of Agricultura Research*, 1938, *37*, 125-143.

(144) *Méthodes officielles d'analyse des laits* admise par la Commission technique permanente du Ministère de l'Agriculture pour l'usage des laboratoires d'Etat (Arrêté du 18 janvier 1907 pris par le Ministère de l'Agriculture et le Ministère du Commerce et de l'Industrie. *Journ. off.* du 9 mars 1907.

(145) Meunier (L.). — Les colloïdes en tannerie. Conférence du Centre de Documentation, 1941, in (34).

(146) Moir (G.-M.). — *The Analyst*, 1931, *56*, 228-225.

(147) Monvoisin (A.). — Le Lait. Physiologie. Analyse. Utilisation, 1920. Asselin et Houzeau, éd., Paris.

(148) Moreno Martin. — *An. Soc. Española Fis. y quim.*, 1936, *33*, 905-930.

(149) Mouriquand (G.). — Equilibre et déséquilibre nutritifs dans leurs rapport avec l'équilibre et le déséquilibre lactés. Extrait du volume édité à l'occasion du Jubilé scientifique du Professeur Porcher, p. 466. An. in *Le Lait*, 1934, *14*, 183-184.

(150) Moutte (M.). — Solubilité en présence de sels neutres et spécificité des hémoglobines sanguines. *Thèse Doct. Pharmacie*, 1941, Marseille.

(151) Münchberg. — *Milchwirtsch. Zentralbl.*, *59*, n° 10, 161-163 in (156).

(152) Müntz. — *Ann. de Chim. et de Phys.*, 1877, *10*, 566.

(153) Neseni (R.). — *Ber. Ges. Physiol. Pharmak.*, 1928, *45*, 608.

(154) Nicloux (M.). — Titrage final de l'ammoniaque dans le microdosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, *21*, 483.

(155) OSBORNE et WAKEMAN. — *J. Biol chim.*, 1918, *33*, 243.
(156) PACCARD (R.). — Etudes sur le lait de femme. *Thèse Doct. Pharmacie*, 1937, Lyon.
(157) PAGET (M.). — Etude de la teneur en matière grasse du lait de vache de race flamande dans la région des Flandres. *Le Lait*, 1928, *8*, 288.
(158) PALMER (L.-S.) and RICHARDSON. — The colloïd chemistry of rennes coagulation. New-York, 1925, in (11).
(159) PATEIN et DUFAU. — *Journ. Pharm. et chim.*, 1902, *16*, 223.
(160) PEDERSEN (K.-O.). — *Biochem. Journ.*, 1936, *30*, 961.
(161) PELLEGRIN (G.). — Guide pratique de l'expert-chimiste en denrées alimentaires. Editions médicales N. Maloine, 1928, Paris.
(162) PENET (G.-P.). — Contribution à l'étude des glucides du plasma sanguin. *Thèse Doct. Pharmacie*, 1940, Marseille.
(163) PETERSEN (W.-E.) and SHAW (J.-C.). — *Journ. of Daisy Science*, 1938, *21*, 168.
(164) PEYROT (M.). — Contribution à l'étude des diverses albumines du lait. *Thèse Doct. Pharmacie*, 1935, Toulouse.
(165) PIETTRE. — *Journ. Pharm. et Chim.*, 1924, *30*, 48.
(166) PIETTRE et VILA. — Application de la méthode à l'acétone à la séparation des matières protéiques du lait. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1926, *3*, 97.
(167) POLONOVSKI (M.) et LESPAGNOL (A.). — Chimie organique et biologique, 1941, 1 vol., Masson et Cie, éd.
(168) POLONOVSKI (M.) et LESPAGNOL (A.). — Semi-microméthode d'analyse rapide et complète du lait de femme. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1930, *104*, 553-557.
(170) PORCHER (C.). — Du chlorure de sodium dans le lait. *Revue générale du lait*, 1906, et *Le Lait*, 1923-3-11.
(170) PORCHER (C.)). — Etude physiologique de la sécrétion lactée in Traité de Physiologie normale et pathologique de Roger et Binet. Masson, éd., 1927, T. 11, pp. 344-345., Paris.
(172) PORCHER (C.). — Le lait au point de vue colloïdal. *Thèse Doct. Sciences*, 1929. *Le Lait*, éd., Lyon.
(173) PORCHER (C.). — Documentation (inédite) relative à la conférence : « Pourquoi le lait de femme ne coagule pas par la presure » (174).
(174) PORCHER (C.). — Pourquoi le lait de femme ne coagule pas par la présure, 1929, Vigot frères, éd., Paris.
(175) PORCHER (C.) et BRIGANDO (J.). — Les différences analytiques de la caséine-acide et de la caséine-présure. *Annales des Falsifications et des Fraudes*, 1929, 22, 143.
(176) PORCHER (C.) et MAYNARD (L.). — La graisse du sang et la graisse du lait pendant la lactation. *Le Lait*, 1930, *10*, 601 et 765.
(177) POZZI-ESCOT (E.). — Le dosage rapide de la matière grasse du lait. Gerber ou Babcock ? *Le Lait*, 1926, *6*, 601.
(178) PRUVOST. — Variations physiologiques de la constitution glucidique du lait. *Thèse Doct. Pharmacie*, 1934, Lille.
(179) PRZYLECKY. — *VI^e Congrès de Chimie biologique*, 1937, 1 vol. Declume, éd., Lons-le-Saunier.
(180) RAFFAELLI. — *Ann. Chim. Applicata*, 1937, 27, 567-571.

(181) RAQUET (D.) et KERVELEO (A.). — Dosage des chlorures dans le lait. *Annales Falsifications et des Fraudes*, 1927, n° 228, 580.
(182) RIMINGTON (C.). — Phosphorylation of proteins. *C. R. des Trav. du Labo. de Carlsberg*, 1927, *17*, n° 2.
(183) RIMINGTON (C.). — Some phosphorus compounds of milk. III. Dephosphorised caseinogen. The action of alkali upon caseinogen. *Biochem. Journ.* 1927, *21*, 204.
(184) RIMINGTON (C.). — The chemistry of the proteins and amino-acide. *An. Rev. of Bioch.*, 1936, *5*, 117-158.
(185) RITTHAUSEN. — *Journ. f. präk. Chem.*, 1877, *15*, 329.
(186) ROBISON (R.). — *Nature*, 1927, *120*, 44.
(187) ROCHE (A.) et DUMAZERT (C.). — Travaux pratiques de Chimie biologique et médicale. Fasc. II, 1942. M. Declume, éd., Lons-le-Saunier.
(188) ROCHE (A.), DORIER (M.) et SAMUEL (L.). — La précipitation des protéines du sérum par le sulfate d'ammonium. L'homme normal. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, *121*, 1019.
(189) ROCHE (J.), DERRIEN (Y.) et AUTRAN. — *Bull. Soc. Chim.*, 1939, *121*, 1019
(190) ROCHE (J.), DERRIEN (Y.) et CHOUAÏECH (M.-S.). — Sur les protéines sanguines de quelques vertébrés marins (protéines sériques et pigments hémoglobiniques). *C. R. Soc. Biol.*, 1939, *130*, 1301.
(191) ROCHE (J.), DERRIEN (Y.) et MOUTTE (M.). — Solubilité dans des solutions salines concentrées et caractères spécifiques des hémoglobines sanguines. *Soc. de Chim. biol.*, 1941, *23*, 2, 1114-1129.
(192) ROCHE (J.), DERRIEN (Y.) et MANDEL (S.). — Séparation de 3 cristalbumines du sérum de cheval. *C. R. Soc. Biol.*, 1944, *138*, 665.
(193) ROCHE (J.), DERRIEN (Y.) et MANDEL (S.). — Nature et fractionnement du séroglycoïde. *C. R. Soc. Biol.*, 1944, *138*, 515.
(194) ROCHE (J.), DERRIEN (Y.) et MANDEL (S.). — Sur le fractionnement des pseudo-globulines du sérum de cheval. *C. R. Soc. Biol.*, 1944, *138*, 651.
(195) ROCHE (J.), DERRIEN (Y.) et VIEIL (H.). — Recherches sur la composition et la spécificité des myoglobines (hémoglobines musculaires). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1942, *24*, 1016-1026.
(196) ROCHE (J.) et DUMAZERT (C.). — Sur les glucides de l'hémolymphe de Cancer pagurus. Nature et rôle physiologique. *An. Inst. Oceano*, 1939, *20*, 87-95.
(197) ROSSIER (A.). — Carences et déséquilibres alimentaires du nourrisson *Bull. de la Soc. Scient. d'Hygiène alimentaire*, 1942, *90*, 63.
(198) ROUVIER (J.). — Le lait. Baillière, éd., 1893, Paris.
(199) ROWLAND (S.-J.). — *Journ. of Dairy Research*, 1937, *8*, 1-5.
(200) ROWLAND (S.-J.). — *Journ. of Dairy Research*, 1938, *9*, 30-41.
(201) RUSZCYNSKY (P.). — *Biochem. Zeits.*, 1924, *152*, 250.
(202) SANDERS (G.-P.). — *Journ. of Dairy Science*, 1938, *21*, 153-154.
(203) SANDERS (G.-P.). — *Journ. of Dairy Science*, 1939, *22*, 841-852.
(204) SCHAEFFER (G.). — Les essais d'interprétation physiologique des fièvres alimentaires du nourrisson. Rapport présenté au VII[e] Congrès des Pédiâtres de langue française, Strasbourg, 5-7 oct. 1931. An. in *Le Lait*, 1934, *14*, 71.

(205) Schlossmann. — Ueber die Eiweisstoffe der Milch. *Zeits. f. physiol. Chem.*, 22, 197 in (*91*).
(206) Schmidt (G.). — *Zeits. f. physiol. Chem.*, 1933, 223, *86* in (*34*).
(207) Schoonjans (A.). — Note sur le dosage de la matière grasse dans les poudres de lait. *Le Lait*, 1925, *5*, 782.
(208) Schwarz (G.) und Schlœmer (A.). — *Molkerei Ztg.*, 1935, *51*, 1465-1468. An. in *Le Lait*, 1939, *19*, 1049.
(209) Sebelien. — *J. Zs. physiol. Chem.*, 1885, *9*, 445.
(210) Sharp (P.-F.) and Mc Inerney (F.-J.). — *Journ. of Dairy Science*, 1936, *19*, 573-579.
(211) Sharp (P.-F.) and Struble (E.-B.). — *Journ. of Dairy Science*, 1935, *18*, 527-538.
(21) Shmakoha (N.-P.). — *Lab. Prakt. U.R.S.S.*, 1939, nos 2 et 3, p. 80. An. in *Le Lait*, 1941, *21*, 184.
(213) Sirks (H.-K.). — *Verslag. Landb. Onderzoek*, 1939, n° 45, p. 47, in *Le Lait*, 1941, *21*, 182.
(214) Sjollema (B.) — Die Bestimmung des Chloreahaltz in geringen Frauenmilchmengen. *Nederl. Tijdsschr. Geneesk*, 1931, 2, 3547.
(215) Soichoro Miura. — *Acta Scholae medicinalis universitatis imperialis in Kioto*, 1917, 2, fasc. 4, in *Le Lait*, 1921, *1*, 517.
(216) Sörensen (M.). — *C. R. Trav. Labo. Carlsberg*, 1938, 22, 487.
(217) Sörensen (M.) and Palmer (A.-H.). — On the dissociation tendency of the crystallin lactoglobulin in very weak solutions of ammonium chloride. *C. R. Trav. Labo. Carlsberg*, 1938, *21*, 284.
(218) Sörensen (S.P.L.). — The constitution of soluble proteins. C. R. Trav. Labo. Carlsberg, 1930, *18*, n° 5.
(219) Sörensen (S.P.L.) and Sladek (I.). — *C.R. Trav. Labo. Carlsberg*, 1929, *17*, n° 14.
(220) Sörensen (S.P.L.) and Sladek (I.). — *Kolloid Zeits.*, 1929, *49*, 16.
(221) Sure Barnett. — *Journ. of nutrition*, 1930, 2, 485-490.
(222) Suttermeister. — Casein and its industrial applications. New-York 1927 in (*12*).
(223) Svedberg Carpenter (L.-M.) and Carpenter (B.-C.). — The molecular weight of casein. *Journ. of the Amer. Chem. Soc.*, 1930, *52*, 241-252
(224) Thieme. — Lehrbuch der Kinderheilkunde von Feer, 1921, S. 5 in (*91*).
(225) Van den Burg (B.) et Koppejan (M.C.A.). — Le dosage du chlore dans le lait. *Le Lait*, 1924, *4*, 81.
(226) Van Slyke (L.-L.) and Bosworth (A.-W.). — *Journ. of Biol. Chem.* 1915, *20*, n° 2.
(227) Van Slyke (L.-L.), Bosworth (A.-W.), Bowdicht and Baker. — Constitution and properties of some casein and paracasein compounds and their relations to cheese. *New-York State agricultural experiment station technical.* Bulletins nos 26, 39, 61, Geneva 1912, 1915-1918 in (*12*).
(228) Vavilov (N.-V.) et Kogan (R.-M.). — *Lab. Prakt. U.R.S.S.* 1937, n° 5, p. 32 an. in *Le Lait*, 1940, *20*, 77.
(229) Velluz (L.). — Chimie et immunité VIe Congrès de Chimie biologique. 1937, 1 vol., Decluме, éd., Lons-le-Saunier.
(230) Vernois et Becquerel. — Du lait chez la femme dans l'état de santé et dans l'état de maladie. Paris, 1853.

(231) Ville (J.) et Derrien (E.). — Chimie biologique médicale. Baillière et fils, éd., 1931, Paris.
(231 bis) Villiers (A.), Collin (E.) et Fayolle (M.). — Aliments lactés et aliments gras. 1911, Doin, éd., Paris.
(232) Vincent (C.) et Vial (M.-J.). — Contribution à l'étude de la lactation humaine. *Le Lait*, 1933, *13*, 686, 697, 989-1006, 1116-1123 et 1250-1256
(233) Vladesco (R.). — La solubilisation de la matière organique du lait. Ses applications. *Le Lait*, 1925, *5*, 479.
(234) Vladesco (R.). — Méthode pour le dosage de la caséine. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, *117*, n° 28.
(235) Vladesco (R.). — Le dosage des chlorures par microsédimentation. Application au lait. *Le Lait*, 1941, *21*, 233-242.
(236) Votocek (E.). — *Mémoires de l'Acad. tchèque des Sciences*, 1915 et *Chem. Ztg.* 1918, p. 257.
(237) Wang (C.-C.) and Wood (A.-A.). — *Amer. Journ. Diseases Children*, 1930, *40*, 787-790.
(238) Watkins. — *J. Biol. Chem.* 1928, *80*, 33 in (*104*).
(239) Widdows, Taite (S.), Lowenfeld (M.-F.), Bond (M.) and Taylor (E.-I.). — A study of the composition of human milk in the later periods of lactation and a comparison with that of early milk. *Biochem. Journ.* 1930, *24*, 327 bis-342.
(241) Zappert u. Jolles. — *Wiener medizin. Wochenscht.*, 1903, 5, 1914.
(242) Zaribnicky (F.). — *Milchwirtschaftliches Zentralblatt*, 1924, *53*, 13-17.

Proposition donnée par la Faculté :

Les alcaloïdes de l'ergot de seigle

VU ET APPROUVE
Le Président du Jury :
Jean Roche

VU ET APPROUVE
Le Doyen :
Jean Roche

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Le Recteur :
P. E. Gau

TABLE DES MATIÈRES

Avant-propos 12

INTRODUCTION 14

I. — De l'intérêt de la technique microanalytique dans l'étude du lait 14
II. — Biochimie analytique du lait. 21
III. — Objet du travail 24

Première partie : RECHERCHES PERSONNELLES SUR LA MICROANALYSE DU LAIT DE FEMME 27
I. — Microdosage des matières grasses 29
II. — » du lactose 41
III. — » des chlorures 47
IV. — » des protéines 55
V. — » de l'extrait sec et des cendres 63
Les centres de donneuses de lait et la détection des fraudes dans le lait de femme 67

Deuxième partie : LES SUCRES COMBINES DU LAIT DE FEMME 83
I. — Introduction 85
II. — Recherches personnelles 88
1. Dosage des sucres combinés totaux du lait 89
2. Glucides faiblement combinés 103
A) Action de l'acide acétique 0,2 N en fonction du temps. 104
B) Comparaison entre les taux de glucides apparus respectivement après hydrolyse sulfurique et après hydrolyse acétique 108
C) Technique de dosage des sucres libérables par hydrolyse acétique 108
3. Sur l'existence de deux fractions distinctes dans les glucides combinés du lait 109
4. Etude de la fermentescibilité des sucres combinés du lait. 109
5. Recherche de la glucosamine 110

Troisième partie : CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA CASEINE DU LAIT DE VACHE 113
I. — Les protéines du lait de vache 115
1. Etat de la caséine dans le lait 115

2. Structure de la caséine. - Comportement vis-à-vis des acides et de la présure 117
3. La caséine est-elle un constituant homogène ? 119
4. Le fractionnement des protéines du lait 126
II. — Recherches personnelles 129
Les méthodes des courbes de solubilité d'après l'équation de Cohn 129
La méthode des courbes de relargage sur le lait de vache. 131

CONCLUSIONS GENERALES 141
I. — L'utilisation de l'ensemble de microméthodes proposées pour l'analyse du lait de femme 141
II. — Sur la nature et sur le rôle des sucres combinés du lait de femme 142
III. — Conséquences théoriques et pratiques de l'application au lait de vache de la méthode des courbes de relargage..... 150

BIBLIOGRAPHIE 155

TABLE DES MATIERES 167

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes chers condisciples, et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et le jure, au nom de l'Etre suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !